

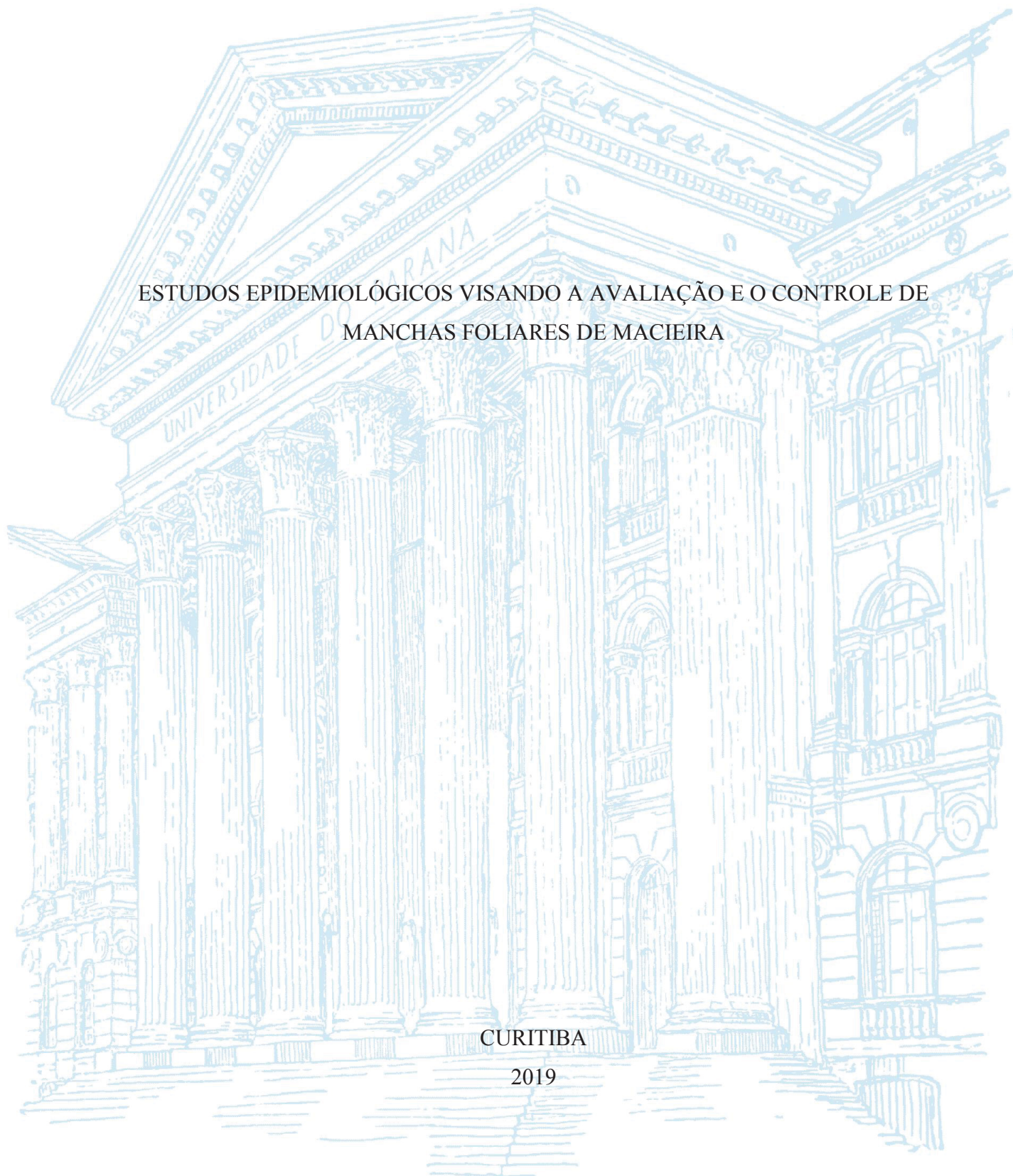
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILLA CASTELLAR

ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS VISANDO A AVALIAÇÃO E O CONTROLE DE
MANCHAS FOLIARES DE MACIEIRA

CURITIBA

2019



CAMILLA CASTELLAR

ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS VISANDO A AVALIAÇÃO E O CONTROLE DE
MANCHAS FOLIARES DE MACIEIRA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Louise Larissa May De Mio

Coorientador: Prof. Dr. Walmes Marques Zeviani

CURITIBA

2019

C348e Castellar, Camilla
Estudos epidemiológicos visando a avaliação e o controle de
manchas foliares de macieira / Camilla Castellar. - Curitiba, 2019.
94 p.: il.,

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia - (Produção Vegetal).
Orientadora: Louise Larissa May De Mio
Coorientador: Walmes Marques Zeviani

1. Maçã - doenças e pragas. 2. Folhas. 3. Fitopatologia. 4.
Pesticidas naturais. 5. Pulverização. I. Mio, Louise Larissa May
De (Orientadora). II. Zeviani, Walmes Marques (Coorientador). III.
Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDU 632:634.11



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001015031P6

TERMO DE APROVAÇÃO

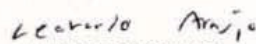
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAMILLA CASTELLAR** intitulada: **ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS VISANDO A AVALIAÇÃO E O CONTROLE DE MANCHAS FOLIARES DE MACIEIRA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

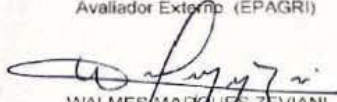
Curitiba, 21 de Fevereiro de 2019.


LOUISE LARISSA MAY-DE-MIO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


LEONARDO ARAUJO

Avaliador Externo (EPAGRI)


WALMES MARQUES ZEVIANI

Avaliador Externo (DEST/ UFPR)


WAGNER VICENTE PEREIRA

Avaliador Externo Pós-Doc (UFPR)

Dedico esta, e todas as minhas outras conquistas, a minha mãe e minha irmã, que sonham
meus sonhos comigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, pela minha família e amigos, por iluminar o meu caminho e por colocar tantas pessoas boas na minha vida durante este período.

A minha família, em especial minha mãe Silvane e minha irmã Bruna, por serem apoio e porto seguro, por todo o amor e paciência. Sem vocês eu não teria chego até aqui. Também agradeço a Teca, pelo carinho incondicional em todos os momentos.

Ao meu namorado Felipe, pela compreensão em todos os momentos, por estar sempre disposto a me ajudar e incentivar, por se preocupar comigo e principalmente pelo amor e carinho.

A professora Louise Larissa May De Mio, pela orientação, pelo conhecimento transmitido, pelo tempo investindo no meu crescimento profissional e por todas as oportunidades oferecidas. Ao professor Walmes Marques Zeviani, pela co-orientação e paciência em tirar dúvidas sobre a estatística.

A minha equipe de campo, Isabela Druciak e Isabel, pelo auxílio nos experimentos de campo, que apesar muitas vezes foram pesados e exaustivos sempre executaram com muita disposição e bom humor. Obrigada por todas as risadas e amizade.

Agradeço aos meus amigos, em especial aos do laboratório, Jhulia, Mônica, Marlon, Carlos, Juliana, Heloisa, Lívia, Daniele, Gabriel, Alexandre, Tiago, Wagner, Rafaele, Pamela, Eliane, Meira, Renan, Gloria. Obrigada pela amizade e momentos de descontração, pelo apoio em momentos difíceis, por se preocuparem comigo. Sou grata por ter amigos tão queridos, que me apoiaram e me ajudaram sempre que foi possível.

Ao Luiz Felipe Cosmo e ao seu Wilson por cederem suas áreas para a condução dos experimentos de campo deste trabalho e pela troca de conhecimento neste período.

E a todos, mesmo que não citados aqui, contribuíram e torceram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

A mancha foliar de *Glomerella* (MFG) e a mancha foliar de *Marssonina* (MFM) são importantes doenças foliares da macieira. Novos produtos e tecnologias de aplicação são necessários para melhorar o manejo para a MFG. Para a MFM, estudos são mais escassos e ainda são necessários desenvolver futuras pesquisas no estudo da epidemia e manejo da doença. Assim, os objetivos do trabalho foram: I) estudar manejos com pesticidas biológicos e botânico no controle da MFG; II) avaliar manejos com produtos aplicados por meio da pulverização eletrostática no controle da MFG; III) propor uma escala diagramática para a avaliação da severidade da MFM e IV) fornecer bases para a escolha do método de avaliação da MFM no campo por meio da quantificação do progresso temporal da doença. Para o objetivo I e II, uma área com inoculação artificial (A_{in}) e uma área onde a doença ocorreu a partir de inóculo natural (A_{n-in}) receberam manejos (M) com 50% da aplicação de pesticidas biológicos e botânico (M_1 , M_2 e M_3) e com apenas produtos químicos (M_4). Os manejos foram comparados com o tratamento testemunha que não recebeu nenhum produto. Para avaliar a pulverização eletrostática, o biofungicida e o mancozebe foram aplicados na forma convencional (volume de 600 L ha⁻¹) e eletrostática (volume de calda de 360 L ha⁻¹) em manejos com os produtos. O M_1 , M_2 , M_3 e M_4 proporcionaram menor severidade na A_{in} e o M_1 e M_4 atrasaram a queda de folhas na A_{n-in} , em relação a testemunha. Os manejos com pulverização eletrostática e a convencional não diferiram no controle da MFG. A cobertura das plantas da pulverização eletrostática com 360 L ha⁻¹ foi menor que a pulverização convencional com 600 L ha⁻¹. Para o objetivo III e IV, uma escala diagramática foi estruturada com base no padrão de folhas sintomáticas do campo. Após seu desenvolvimento, 12 avaliadores atribuíram valores de severidade de amostras com e sem o uso da escala. Parâmetros estatísticos relativos a acurácia, precisão e reprodutibilidade foram obtidos com as estimativas. O progresso temporal da MFM foi avaliado em folhas velhas e novas de ramos-do-ano selecionados e em folhas de amostragens destrutivas oriundas de diferentes porções da copa. Variáveis epidemiológicas foram calculadas e parâmetros foram estimados pelo modelo exponencial para comparar a folhas velhas e novas e as alturas da copa. A escala foi estruturada com 10 diagramas com níveis de severidade que variaram de 0,2% a 96%. Os parâmetros relativos a precisão, acurácia e reprodutibilidade das estimativas foram melhorados quando a escala foi utilizada. Nas avaliações do progresso temporal em amostragens destrutivas, uma redução de 7% de severidade ocorreu entre fevereiro e março, sugerindo um erro experimental. Nestas avaliações, a severidade média entre alturas da copa foram diferentes. As folhas novas dos ramos selecionados tiveram tendência de cair após as folhas velhas e também tiveram maior quantidade de doença final. De acordo com os resultados, formas de avaliações da MFM, relacionadas a possíveis objetivos, foram discutidas.

PALAVRAS-CHAVE: *Malus domestica*. *Colletotrichum* spp.. *Marssonina coronaria*.
Progresso temporal.

ABSTRACT

Glomerella leaf spot (GLS) and Marssonina leaf blotch (MLB) are important foliar diseases of the apple tree. New products and application technologies are needed to improve management for GLS. For MLB, studies are scarcer and further research is needed to study the epidemic and manage the disease. Thus, the objectives of the work were: I) to study management with biological and botanical pesticides in the control of GLS; II) to evaluate the management of products applied by means of electrostatic spraying in the control of GLS; III) to propose a standard area diagrams set (SADs) for the evaluation of the severity of MLB and; IV) to provide bases for the choice of the method of evaluation of MLB in the field by means of the evaluation of the temporal progress of the disease. For objective I and II, an area with artificial inoculation (A_{in}) and an area where the disease occurred from natural inoculum (A_{n-in}) were treated with 50% of the application of biological and botanical pesticides (M_1 , M_2 and M_3) and with only chemicals (M_4). The treatments were compared with the control that did not receive any product. In order to evaluate electrostatic spraying, biofungicide and mancozeb were applied in the conventional form (volume spray of 600 L ha⁻¹) and electrostatic (volume spray of 360 L ha⁻¹) in managements with the products. M_1 , M_2 , M_3 and M_4 provided lower severity in A_{in} and M_1 and M_4 delayed leaf drop in A_{n-in} , relative to control. Electrostatic and conventional spraying operations did not differ in MFG control. The coverage of the electrostatic spraying plants with 360 L ha⁻¹ was lower than the conventional spraying with 600 L ha⁻¹. For objective III and IV, a SADs was structured based on the pattern of symptomatic leaves of the field. After its development, 12 raters assigned values of severity of samples with and without the use of the scale. Statistical parameters related to accuracy, precision and reproducibility were obtained with the estimates. The temporal progress of MLB was evaluated in old and new leaves of selected shoots and in destructive sampling leaves from different heights of the canopy. Epidemiological variables were calculated and parameters were estimated by the exponential model to compare the old and new leaves and canopy heights. The SADs was structured with 10 diagrams with severity levels ranging from 0.2% to 96%. The parameters related to the accuracy, accuracy and reproducibility of the estimates were improved when the SADs was used. In evaluations of temporal progress in destructive samplings, a 7% reduction in severity occurred between February and March, suggesting an experimental error. In these evaluations, the average severity of canopy heights were different. New leaves of the selected shoots tended to fall after the old leaves and also had greater amount of final disease. According to the results, forms of MLB evaluations related to possible objectives were discussed.

KEY-WORDS: *Malus domestica*. *Colletotrichum* spp.. *Marssonina coronaria*. Temporal progress.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 CULTURA DA MACIEIRA.....	13
2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS DOENÇAS DE VERÃO DA MACIEIRA.....	14
2.3 EPIDEMIOLOGIA DA MANCHA FOLIAR DE MARSSONINA.....	16
2.3.1 Ciclo da doença	16
2.3.1.1 Sobrevivência	16
2.3.1.2 Disseminação	17
2.3.1.3 Infecção e colonização	18
2.3.1.4 Reprodução	19
2.3.2 Fitopatometria.....	19
2.3.3 Progresso temporal e espacial da epidemia	20
3 CAPÍTULO I: PESTICIDAS BIOLÓGICOS E PULVERIZAÇÃO	
ELETRÓSTÁTICA NO MANEJO DA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA EM	
MACIEIRA.....	22
3.1. Introdução	23
3.2. Material e métodos	26
3.2.1. Pesticidas biológicos no manejo da MFG	26
3.2.1.1. Experimentos conduzidos em campo	26
3.2.1.1.1. Áreas experimentais	26
3.2.1.1.3. Avaliação da doença.....	29
3.2.1.2. Concentração mínima inibitória dos produtos.....	30
3.2.2. Pulverização eletrostática no manejo da MFG	31
3.2.2.2. Cobertura das plantas pelas pulverizações	32
3.2.3. Cálculo de variáveis epidemiológicas e análise de dados	33
3.3. Resultados	35
3.3.1. Pesticidas biológicos e botânico no manejo da MFG.....	35
3.3.1.1. Influência de manejos no progresso temporal da doença na A_{in}	35
3.3.1.2. Influência de manejos no progresso temporal da doença na A_{n-in}	37
3.3.1.3. Concentração mínima inibitória dos produtos.....	40
3.3.2. Pulverização eletrostática no manejo da MFG	41
3.3.2.1. Progresso temporal da MFG com a pulverização eletrostática	41

3.3.2.2. Cobertura das pulverizações	43
3.4. Discussão	44
3.5. Conclusões	49
4 CAPÍTULO II: ESCALA DIAGRAMÁTICA PROPOSTA E PROGRESSO	
TEMPORAL DA MANCHA FOLIAR DE MARSSONINA EM MACIEIRA COMO	
BASE PARA ESCOLHA DE MÉTODO DE AVALIAÇÃO	54
4.1 Introdução	55
4.2 Material e métodos	56
4.2.1 Desenvolvimento e validação de escala diagramática.....	56
4.2.2 Progresso temporal da MFM	57
4.2.2.1 Descrição do campo experimental.....	57
4.2.2.2 Avaliação por amostragens destrutivas e Índice de Área Foliar	58
4.2.2.3 Avaliação em ramos selecionados	59
4.2.3 Estatística descritiva e análise de dados	59
4.3 Resultados	61
4.3.1 Escala diagramática para MFM.....	61
4.3.2 Progresso temporal da MFM	64
4.3.2.1 Avaliação em folhas de amostragens destrutivas e índice de área foliar.....	64
4.3.2.2 Avaliação em ramos selecionados	65
4.4 DISCUSSÃO	66
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
6 REFERÊNCIAS	77
7 ANEXOS	88
8 APÊNDICES	89

1 INTRODUÇÃO GERAL

A macieira é uma frutífera de clima temperado cultivada em vários países do mundo. No Brasil, a produção está concentrada nos estados da região Sul (IBGE, 2017), onde ocorrem condições climáticas propícias ao seu cultivo. A Mancha Foliar de Glomerella (MFG) e a Mancha Foliar de Marssonina (MFM) são doenças importantes da cultura, e ocasionam lesões foliares (HARADA et al., 1974; LEE et al., 2011) e a desfolha precoce (SHARMA; GAUTAM, 1997; CRUSIUS et al., 2002; KATSURAYAMA; BONETI, 2009). Ambas são consideradas doenças de verão da macieira, pois são favorecidas por temperaturas acima de 20°C e alta umidade relativa do ar (CRUSIUS et al., 2002; HAMADA, 2005; SHARMA et al., 2009).

A MFG é ocasionada por espécies de *Colletotrichum*. A doença foi relata provocando sintomas severos no Brasil (BECKER et al., 2000), Estados Unidos (GONZÁLEZ et al., 2006) e China (WANG et al., 2012). No Brasil, a doença é de difícil controle e tem causado danos na cultivar Gala, a mais plantada no país (PETRI et al., 2011). Em razão disso, os produtores têm renovado os pomares com a cultivar Eva, lançada como resistente a MFG (HAUAGGE; TSUNETTA, 1999). No entanto, sintomas severos da doença foram relatados também para esta cultivar (MOREIRA, 2017).

O principal método de controle da MFG é a aplicação de fungicidas durante o ciclo vegetativo da macieira (KATSURAYAMA; BONETI, 2009). No entanto, devido ao período de carência dos fungicidas, estes produtos não podem ser pulverizados entre janeiro e fevereiro, quando ocorre a colheita de frutos. Este período coincide com condições climáticas favoráveis, o que leva a grande severidade da doença (HAMADA, 2013) e deixa os pomares em alta pressão de inóculo (KOWATA et al., 2010). O uso intensivo de fungicidas, especialmente quando ocorre alta pressão de inóculo, pode acarretar na seleção de populações de patógenos menos sensíveis aos produtos. A redução de sensibilidade de isolados de *Colletotrichum* associados a MFG já foi relatada para os fungicidas benomyl (HAMADA et al., 2009), tiofanato metílico e mancozebe (MOREIRA et al., 2017). Outro fator a considerar na proteção das plantas refere-se a tecnologia de aplicação. O porte e arquitetura das frutíferas torna difícil uma cobertura uniforme em todas as regiões da copa. Visando o controle da MFG, é necessário que a pulverização atinja o terço superior da copa, pois a doença ocorre com maior intensidade nesta altura (HAMADA, 2013) e, proteja a superfície abaxial das folhas, pois a germinação de conídios também pode ocorrer por esta

superfície (MOREIRA; MAY DE MIO, 2015). A pulverização adotada convencionalmente nos pomares, possivelmente não atinge estas regiões (HIGASHIBARA et al., 2013).

Assim, há uma demanda por novos produtos para o manejo da doença e tecnologias de aplicação que se ajustem ao patossistema. Bactérias antagonistas e substâncias extraídas de plantas têm sido estudadas para controle de doenças foliares e doenças pós colheita por terem um apelo sustentável pelo consumidor e reduzirem a pressão de seleção de populações resistentes aos fungicidas (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006; DEMERUTIS, et al., 2008; FU et al., 2010; ROHINI et al., 2016; GADHI et al., 2018). Para a MFG, bactérias e óleos essenciais com resultados promissores no controle *in vitro* também foram identificados (MOREIRA et al., 2014; SCHORR, 2018). Entretanto, quando são aplicadas no campo, a eficiência dos produtos podem não corresponder ao seu potencial *in vitro* em função de falhas na cobertura e baixa sobrevivência de agentes biológicos (MOREIRA e MAY DE MIO, 2015). Uma das formas de garantir o controle em condições naturais é a formulação com adjuvantes, substâncias que podem aumentar a cobertura e eficiência de produtos (GENT et al., 2003; ZYL et al., 2010). Quanto a tecnologia de aplicação, a pulverização eletrostática é uma opção para otimizar a cobertura das plantas. Nesta tecnologia, as gotas são liberadas do pulverizador após uma transformação elétrica que as deixa com carga oposta ao da superfície das folhas. Assim, a gota é atraída pelas folhas da planta e partes da copa, dificilmente atingidas pela pulverização convencional, podem ficar protegidas mesmo com redução do volume de calda (CHAIM, 2007).

A mancha foliar de Marssonina (MFM) é ocasionada pela espécie *Marssonina coronaria* e ocasiona sintomas severos em pomares da Índia (SHARMA et al., 2004). No Brasil, apesar da sua primeira ocorrência ter sido relatada em 1986, a doença não era considerada importante. No entanto, a MFM tem preocupado produtores nos últimos anos, principalmente aqueles de regiões mais quentes, como Paraná e São Paulo.

Embora existam alguns trabalhos epidemiológicos relativos a MFM, métodos de quantificação da doença não foram definidos. A avaliação da severidade tem sido realizada de forma não padronizada e os métodos utilizados não são validados para a doença (SHARMA et al., 2011; KUMAR; SHARMA, 2014; VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2014; RATHER et al., 2017). Além disso, as avaliações no campo de futuros experimentos, os quais são necessários para esclarecer alguns aspectos epidemiológicos, devem considerar o comportamento da doença. Porém, a epidemia ainda é pouco descrita e detalhada

(SHARMA et al., 2004; JIANG et al., 2011) para que seja identificada a forma de avaliação adequada para os experimentos de campo.

Uma metodologia de avaliação validada e que se ajuste ao comportamento da epidemia no campo é necessária para que os resultados da pesquisa representem a realidade e, conseqüentemente, levem a conclusões confiáveis. Estimativas de severidade com o auxílio de escalas diagramáticas, que consistem em sequências de imagens com a planta inteira, ou parte da mesma, com diferentes proporções da doença, tem melhorado a acurácia, precisão e reprodutibilidade das avaliações em doenças de frutíferas (MICHEREFF et al., 2009; DOLINSKI et al., 2017; MOREIRA *et al.*, 2018). Além disso, estudos que descrevam com mais detalhes a epidemia no campo podem auxiliar na identificação de metodologias adequadas para avaliação no campo.

Considerando que novos produtos e a pulverização eletrostática podem melhorar o manejo da MFG, os objetivos do primeiro capítulo desta dissertação foram: I) estudar manejos com pesticidas biológicos, ou seja, formulados de bactérias antagonistas e de substâncias extraídas de plantas que reduziram o crescimento micelial e germinação de conídios e; II) avaliar manejos com produtos aplicados por meio da pulverização eletrostática. Considerando que uma escala diagramática e metodologias de avaliação, que se ajustem ao comportamento da doença, podem levar a resultados que representem a epidemia no campo, os objetivos do segundo capítulo desta dissertação foram: III) propor uma escala diagramática para a avaliação da severidade da doença e; IV) fornecer bases para a escolha do método de avaliação no campo, por meio da avaliação do progresso temporal considerando duas formas de avaliação e o comportamento da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DA MACIEIRA

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é cultivada em muitos países do mundo. A China é o maior produtor mundial de maçãs, com produção de 41.391.500 toneladas em 2017 (FAO, 2017). Estados Unidos (5.173.670 toneladas), Turquia (3.032.164 toneladas), Polônia (2.441.393 toneladas) e Itália (1.921.272 toneladas) se destacam, respectivamente, como segundo, terceiro, quarto e quinto maior produtor do mundo (FAO, 2017). O Brasil, ocupa a 12ª posição mundial, com 33.138 ha colhidos em 2017 e produção de 1.300.943 toneladas (IBGE, 2017). A região de cultivo deste país se concentra principalmente nos estados do Sul. Em 2017, Santa Catarina produziu 679.836 toneladas, o Rio Grande do Sul, 577.774 toneladas e o Paraná, em terceira posição com 34.349 toneladas da fruta (IBGE, 2017).

Os frutos produzidos são destinados em quase totalidade ao consumo *in natura* e por isso, as cultivares plantadas são escolhidas pelo produtor pela associação de fatores climáticos da região e pela preferência do consumidor. As cultivares Gala e Fuji representam grande importância correspondendo, em 2011, a 30 e 60% da produção nacional (PETRI et al., 2011) e 14,89% e 7,20% do que é produzido no mundo, respectivamente (FACHINELLO et al., 2011). Os frutos da ‘Gala’ têm a epiderme vermelho-rajada sobre um fundo amarelo, com polpa firme, crocante, suculenta e teor ácidos e sólidos solúveis balanceados. Os frutos da cultivar Fuji são achatados, com coloração rosa-pálido, e polpa aromática, firme, crocante, suculenta e sabor doce (CAMILO; DENARDI, 2002).

A macieira é considerada uma frutífera de clima temperado. Estas frutíferas apresentam o ciclo com duas estações. A estação vegetativa é caracterizada pelo processo fotossintético e a produção de frutos. No final desta fase, as folhas caem e a planta entra na estação de repouso, também conhecida como dormência. Neste período, a planta permanece sob baixas atividades metabólicas até que ocorram condições ambientais favoráveis para o início de nova estação vegetativa (PETRI et al., 2002).

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS DOENÇAS DE VERÃO DA MACIEIRA

A Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG) e a Mancha foliar de *Marssonina* (MFM) são doenças importantes que ocorrem durante o ciclo vegetativo da macieira. Ambas doenças são relatadas como doenças de verão, pois são favorecidas por temperaturas acima de 20°C e alta umidade relativa do ar (SHARMA et al., 2009; HAMADA, 2005; CRUSIUS et al., 2002).

A MFG ocasiona sintomas severos no Brasil (BECKER et al., 2000), Estados Unidos (GONZÁLEZ et al., 2006) e China (WANG et al., 2012). No Brasil, a doença tem causado danos na cultivar Gala, principalmente no Paraná, pois neste estado ocorre clima favorável ao patógeno, o que deixa os pomares em alta pressão de inóculo (KOWATA et al., 2010). Os sintomas típicos da MFG são lesões avermelhadas de formato irregular, que evoluem para manchas amarelo-acinzentadas (Figura 1A). No centro das lesões mais velhas podem aparecer pontuações escuras, que são os corpos de frutificação do fungo, onde se alojam os conídios. As folhas infectadas podem cair (CRUSIUS et al., 2002), sendo observados até 75% de desfolha em condições favoráveis (KATSURAYAMA; BONETI, 2009).

A MFG é ocasionada por espécies de *Colletotrichum*. As espécies associadas a doença mais frequentes nos pomares das regiões brasileiras produtoras são *C. nymphaeae*, pertencente ao complexo *C. acutatum*, e *C. fructicola*, pertencente ao complexo *C. gloeosporioides* (MOREIRA et al., 2019). O controle químico é o principal método de controle da MFG e, em locais onde a doença é importante, a mesma é foco nos calendários de pulverização. Mesmo com a adoção de práticas de controle nas regiões subtropicais, favoráveis a doença, produtores relatam que ocorre enfraquecimento das plantas com sintomas, e consequentemente, redução da produtividade. Assim, devido as perdas ocasionadas pela doença, pomares de ‘Gala’ têm sido substituídos pela cultivar Eva, lançada como resistente a esta doença (HAUAGGE e TSUNETTA, 1999). No entanto, sintomas severos da MFG também foram relatados nesta cultivar (Moreira, 2017).

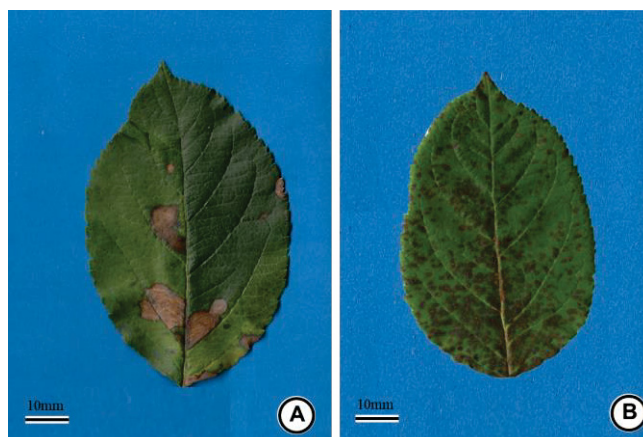
A MFM vem ganhando atenção no contexto mundial nos últimos anos. A doença está presente em todas as regiões onde há a pomicultura (CABI/EPPO, 2014) e afeta a maioria das cultivares comerciais disponíveis (JUNIOR et al., 1986; KRETZSCHMAR et al. 2005; SHARMA et al., 2011; KUMAR; SHARMA, 2014). O agente causal da MFM é a espécie *Marssonina coronaria* (Ellis & J. J. Davis), cuja fase sexuada se denomina *Diplocarpon mali* (Y. Harada & K. Sawamura). Os sintomas são pequenas manchas marrom-acinzentadas com 5 a 10 mm de diâmetro e halo arroxeado (Figura 1B). No interior

das lesões são encontrados os acérvulos, corpos de frutificação do patógeno, onde alojam-se os conídios. Os conídios são hialinos, retos a ligeiramente curvos, obovóides, e com duas células desiguais, variando de 12×4 a 20×6 µm em tamanho (HARADA et al., 1974; LEE et al., 2011). Esta doença também tem sido relacionada com a desfolha precoce. Sob condições favoráveis e ausência de medidas de controle, Sharma e Gautam (1997) notaram que a MFM pode acarretar na desfolha total da planta anteriormente à colheita dos frutos. A cultivar Eva, a qual tem substituído os pomares de Gala, tem apresentado alta incidência de MFM, preocupando os produtores.

Especificamente para a MFG e a MFM não foram encontrados estudos que relacionassem os sintomas com os danos causados por essas doenças. Mas, no geral, lesões foliares interferem na fotossíntese, o que reflete em menor quantidade de fotoassimilados para o enchimento dos frutos e conseqüentemente menor produtividade, assim como relatado para mancha angular, ferrugem e antracnose do feijão (BERGAMIN et al., 1997; BASSANEZI et al., 2001). Da mesma forma, não foram encontrados estudos epidemiológicos relacionando sintomas e desfolha precoce. Contudo, em frutíferas de clima temperado a antecipação da queda da folha pode acarretar em desordem fisiológica e reduzir a produção nas próximas safras (SOTO-ESTRADA; ADASKAVEG, 2004; OJIAMBO et al., 2006).

A MFG tem preocupado produtores brasileiros desde a década de 70, devido aos seus danos e dificuldades no controle. Pesquisadores tem realizado esforços no estudo da epidemiologia da doença, pois o seu conhecimento é fundamental para atingir sucesso no controle (WAGGONER; AYLOR, 2000). Revisões bibliográficas referentes a epidemiologia da MFG estão expostas na tese de Hamada (2013) e mais recentemente em Moreira (2017) do grupo do Laboratório de Epidemiologia para o Manejo Integrado de Doenças de Plantas (LEMID) da Universidade Federal do Paraná. Para a MFM, apesar do primeiro relato ter ocorrido em 1986 (JUNIOR et al., 1986), a doença sempre foi tratada como secundária e, em função disso, pouco estudada no Brasil. Sendo assim, a presente revisão trará informações sobre os aspectos epidemiológicos da MFM até o momento.

FIGURA 1. SINTOMAS DE MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA (A) E MANCHA FOLIAR DE MARSSONINA (B) EM FOLHAS DE MACIEIRA.



FONTE: CASTELLAR, C.

2.3 EPIDEMIOLOGIA DA MANCHA FOLIAR DE MARSSONINA

2.3.1 Ciclo da doença

2.3.1.1 Sobrevivência

Em 1974, no Japão, quando a doença foi descrita pela primeira vez, foram observados apotécios liberando ascósporos na superfície de folhas caídas no solo após o inverno (HARADA, et al. 1974). Em estudo chinês, observou-se que o patógeno pode sobreviver tanto nas folhas caídas no solo quanto em agregados de hifas. A primeira, como protoapotécio que amadurece formando apotécio produzindo ascósporos, e a segunda na forma de agregado de hifas que se diferencia em acérvulos produzindo conídios (YI-CUN, 1986). Estas observações sugerem o caráter heterogêneo da cadeia de infecção da doença, ou seja, ocorre o aporte de duas formas de esporos para o sistema.

Partindo do pressuposto da sobrevivência de *M. coronaria* em folhas caídas no solo, Sharma et al. (2009) investigaram a formação de estruturas reprodutivas em folhas sintomáticas destacadas da planta no final da estação vegetativa. Os resultados do trabalho mostraram que o fungo é capaz de formar novos acérvulos em até 8 meses de incubação em condições de campo (com neve, no caso) e sob refrigeração. Em contrapartida, a porcentagem de germinação média dos conídios reduziu de 67,72% no segundo mês, para

33,8% no décimo segundo mês de avaliação. Apesar da perda de viabilidade dos esporos no decorrer do tempo, ainda assim destaca-se a importância dessa estrutura como inoculo primário. Não foi detectada a formação de apotécio e ascósporos nesse trabalho, mesmo que as condições inverniais dos pomares deste experimento apresentassem deposição de neve no solo, assim como na China e Japão onde previamente foram observadas estas estruturas (YI-CUN, 1986; HARADA, et al. 1974).

O sistema de cultivo de macieira também permite outras formas de sobrevivência dos fitopatógenos. Espécies do gênero *Colletotrichum*, causadores da Mancha Foliar de Glomerella, por exemplo, também sobrevivem superficialmente em ramos e gemas dormentes da macieira durante o inverno (CRUSIUS et al., 2002; HAMADA; MAY DE MIO, 2017). Plantas daninhas que coexistem no pomar, cultivos próximos com outras frutíferas ou até mesmo plantas arbóreas da área de preservação da propriedade podem funcionar como hospedeiros alternativos. No entanto, para *M. coronaria* estas questões ainda não são elucidadas.

2.3.1.2 Disseminação

No ciclo primário, os esporos de *M. coronaria* começam a ser liberados das folhas caídas no solo durante a brotação da macieira (YI-CUN, 1986). Contudo, não são encontrados estudos referentes ao mecanismo de liberação e dispersão do patógeno. A espécie de mesmo gênero, *M. rosea*, agente causal da mancha preta em roseira, necessita de água para a liberação dos esporos das folhas, sendo que, 30 gotas sobre os acérvulos resultam na liberação de 100% dos conídios (SAUNDERS, 1966).

A dispersão e deposição também parecem ser dependentes de água para outras espécies do gênero *Marssonina*. Em estudo de *M. brunnea* em álamo, houve concentração de conídios em coletores de chuva (PINON; POISSONNIER, 1975) e *M. rosea* apresenta dependência de respingos de água para sua dispersão (SAUNDERS, 1966). Apesar da possibilidade de semelhanças na forma de disseminação para as espécies do gênero *Marssonina*, ainda é necessário o estudo desse processo para elucidar especificidades que possam ocorrer entre *Malus domestica* x *Marssonina coronaria* e, consequentemente, suas implicações nos padrões da doença no campo.

2.3.1.3 Infecção e colonização

Após a deposição dos esporos em tecido suscetível, sob condições favoráveis, inicia-se a infecção. Para *M. coronaria* este processo pode ocorrer em uma ampla faixa de umidade e temperatura, que abrange de 50-100% de umidade relativa do ar e de 5-30°C. Porém considera-se que a temperatura e umidade ótimas são de 20°C e 100%, respectivamente (SHARMA *et al.*, 2009). A velocidade de germinação dos conídios em alta umidade relativa e temperatura de 25°C foi estudada em microscopia eletrônica por Zhao *et al.* (2013) e em ensaios de germinação *in vitro* por Sharma *et al.* (2009). Em Zhao *et al.* (2013) a germinação ocorreu 6 horas após a inoculação em folhas, sendo que, após 24 horas, mais de 80% dos conídios germinaram. Entretanto, em Sharma *et al.* (2009), somente após 72 horas de incubação houve 48% de germinação. A diferença da velocidade de germinação nos dois trabalhos sugere duas hipóteses. A primeira é a presença do hospedeiro aumentando a velocidade da germinação em Zhao *et al.* (2013). A segunda é a concentração maior de inóculo Zhao *et al.* (2013) acelerando a germinação. Em *M. rosae*, o aumento na concentração de conídios é proporcional ao aumento na velocidade de germinação dos mesmos (SAUNDERS, 1966).

Conídios de *M. coronaria* podem germinar e penetrar tanto na superfície abaxial, quanto adaxial das folhas do hospedeiro (ZHAO *et al.*, 2013). A penetração ocorre pela cutícula foliar (ZHAO *et al.*, 2013) e portanto, não depende de períodos específicos de abertura estomática. Após a penetração, o patógeno emite uma hifa intracelular que rompe a membrana e ataca diretamente o citoplasma. Concomitantemente, uma hifa subcuticular é desenvolvida e gera hifas intercelulares. Inclusive, estudos mostram uma relação de resistência do hospedeiro relacionada com a velocidade de crescimento da hifa subcuticular (WANG *et al.*, 2014). Além disso, a idade da folha parece também influenciar o processo de infecção. Kumar e Sharma (2014) mostraram que folhas novas não apresentaram incidência da doença mesmo 21 dias após a inoculação do patógeno, enquanto que folhas velhas atingiram severidade de 63% no vigésimo primeiro dia após a inoculação.

Após o estabelecimento de relações parasitárias estáveis, sob condições de 25°C e umidade relativa acima de 95% durante todo o experimento, os primeiros sintomas foram observados no sexto dia após a inoculação na cultivar 'Fuji' (ZHAO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014). No entanto, o período de incubação nesta mesma cultivar foi de 11 dias em Kumar e Sharma (2014), possivelmente em função do período de molhamento ter sido somente de 24 horas. Além da possível influência do molhamento foliar no período de

incubação, evidências experimentais sugerem que, quanto maior o período de umidade, maior a porcentagem de doença (SHARMA et al., 2009).

2.3.1.4 Reprodução

O período de latência do patógeno é muito próximo ao seu período de incubação, pois acérvulos podem ser liberados cerca de 1 a 2 dias após a manifestação dos primeiros sintomas (ZHAO et al., 2013; WANG et al., 2014).

Para formação dos acérvulos, a hifa subcuticular emite estruturas semelhantes a dedos que se diferenciam em conidióforos e conídios. Após isso, com a expansão da mesma hifa, novos acérvulos são formados ao longo do tempo (ZHAO et al., 2013). Portanto, mesmo na ausência de inoculo, novos acérvulos podem ser formados. Mediante a coleta de folhas infectadas no final da estação de crescimento da macieira, e armazenadas a 25°C, o número de acérvulos em discos de folhas aumentou de 53, no segundo mês de avaliação, para 145, no oitavo mês de avaliação (SHARMA et al., 2009). Estes resultados evidenciam a expansão e atuação da hifa subcuticular.

A produção de conídios por lesão pode variar de acordo com a suscetibilidade da cultivar. Em ‘Gala’, considerada como cultivar moderadamente suscetível, o número de conídios por lesão foi de 14×10^4 conídios ml^{-1} e na cultivar Starking Delicious, designada como altamente suscetível houve produção de $34,68 \times 10^4$ conídios ml^{-1} (KUMAR; SHARMA, 2014). Não há relatos do período infeccioso da doença.

2.3.2 Fitopatometria

Nos estudos relacionados a quantificação da MFM não há uma padronização na sua forma de avaliação. Dang *et al.* (2017) avalia a eficiência de controle químico pela incidência da doença. Sharma *et al.* (2009) realizam avaliação sobre a influência da temperatura e molhamento foliar no desenvolvimento da doença por meio de escala de notas baseada na incidência de folhas doentes na planta associada a desfolha aparente. Outros trabalhos utilizam a severidade como variável. Neste caso, os valores são estimados com auxílio escala de notas para a severidade da doença (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2014; RATHER et al., 2017) as quais não são padronizadas entre os trabalhos, ou por meio

de avaliações subjetivas, sem nenhum auxílio (SHARMA et al., 2011; KUMAR; SHARMA, 2014).

O recomendado para avaliação de severidade é por meio de escalas diagramáticas, que são esquemas ilustrados que balizam o valor a ser estimado. Estimativas que não são atribuídas por métodos validados, os quais garantem precisão e acurácia, pode gerar resultados imprecisos e comprometer o desfecho das pesquisas.

2.3.3 Progresso temporal e espacial da epidemia

Ao longo de várias safras, as epidemias podem se comportar de diversas maneiras de acordo com suas características. No caso da MFM, em estudo conduzido na China durante 10 anos (JIANG et al., 2011) foi notado que a epidemia teve um padrão. Na região em questão, a doença teve início em maio e atingiu o seu máximo de intensidade em outubro e posteriormente voltou a reduzir.

Dentro de uma mesma safra, trabalhos com curvas de progresso da MFM não são encontrados. Mas, no intuito de caracterizar a influência de fatores meteorológicos numa epidemia de MFM, um trabalho indiano quantificou a severidade da doença durante os meses de crescimento vegetativo de macieira. Nesse trabalho foi calculado a taxa de progresso da doença considerando a fórmula do modelo logístico (JIANG et al., 2011). Nas duas regiões avaliadas, observou-se que, a epidemia teve uma duração de 12 semanas, iniciando na brotação da cultura em julho estendendo-se até a primeira semana de outubro. Em julho foi observado a maior taxa de crescimento da epidemia, fato que pode ser justificado pela presença do maior número de sítios de infecção. Nos meses subsequentes, a taxa decresceu de uma média de 0,05 em agosto para 0,009 em outubro. Com base em informações de ensaios *in vitro* sobre a faixa ótima de temperatura e umidade para o desenvolvimento da doença (SHARMA et al., 2009), pode-se dizer que as condições meteorológicas durante o experimento foram favoráveis para *M. coronaria*, levando a severidade média da doença de aproximadamente 91,5% no início de outubro (JIANG et al., 2011).

Além da caracterização entre as interações de patógeno, ambiente e hospedeiro, o progresso temporal também pode auxiliar na comparação de diferentes cultivares. A variável de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da MFM pode variar entre

cultivares de macieira (SHARMA et al., 2011). A AACPD variou de 0,75 a 2,7 em genótipo considerados “resistentes” e de 11,55 a 23,25 em cultivares “altamente suscetíveis”.

Dentro de uma mesma planta, verticalmente, observam-se que os sintomas da doença iniciam na parte inferior do dossel e posteriormente se espalham para o resto da copa (SHARMA et al., 2004). Esta constatação pode ser justificada pela proximidade da fonte de inóculo primário, em que evidências sugerem que a mesma esteja nas folhas caídas no solo (YI-CUN, 1986; HARADA et al. 1974). No entanto, metodologias científicas adequadas precisam ser empregadas para confirmar a hipótese.

Dentro de um pomar ou área, é desconhecido o padrão espacial que a MFM segue. Mas, conforme descrito anteriormente, outras espécies do gênero *Marssonina* apresentam disseminação dependente de água (SAUNDERS, 1966; PINON; POISSONNIER, 1975). Caso *M. coronaria* seja semelhante, espera-se que a doença tenha padrão espacial agregado.

CAPÍTULO I: PESTICIDAS BIOLÓGICOS E PULVERIZAÇÃO ELETROSTÁTICA NO MANEJO DA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA EM MACIEIRA¹

Camilla Castellar^a; Isabela Cristina Druciak^a; Walmes Marques Zeviani^a; Louise
Larissa May De Mio^a

^aDepartamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná,
80035-050, Brasil.

Camilla, C. (Autor correspondente) E-mail: camillacastellar12@gmail.com;
Druciak, I.C. E-mail: isabela.druciak@gmail.com;
Zeviani, W.M. E-mail: zeviani@ufpr.br;
May De Mio, L.L. E-mail: maydemio@ufpr.br.

DESTAQUES

- Manejos incluindo 50% de aplicação de pesticidas biológicos reduziram a severidade da Mancha Foliar de Glomerella em macieira.
- Aplicações de mancozebe e de *Bacillus alcalophilus* formulado atrasaram a queda de folhas sintomáticas.
- A pulverização eletrostática com redução de volume de calda manteve controle da mancha foliar de Glomerella.

¹ Capítulo normatizado segundo padrões da revista *Biological Control*, exceto o idioma. Na sequência o artigo será traduzido para a língua inglesa por empresa certificada.

RESUMO

A mancha foliar de *Glomerella* (MFG) em macieiras é ocasionada por espécies de *Colletotrichum*. Segundo estudos epidemiológicos em regiões com alta pressão de inóculo, novas opções de produtos e tecnologias de aplicação de fungicidas são necessárias no manejo integrado da doença para reduzir o risco de epidemias após a colheita. Assim, o trabalho objetivou I) estudar manejos com a integração de pesticidas biológicos e fungicidas para o controle da MFG e II) avaliar a tecnologia de aplicação eletrostática para um biofungicida e um produto químico como alternativa para aumentar a cobertura das plantas e o controle da doença. Uma área com inoculação artificial (A_{in}) e uma área onde a doença ocorreu a partir de inóculo natural (A_{n-in}) foram utilizadas para os dois objetivos. Nas duas áreas o produto tecnológico 1 (formulação de *Bacillus alcalophilus*), produto tecnológico 2 (formulação de extratos naturais), biofungicida (produto comercial composto por *B. subtilis*) e um padrão químico comparativo (mancozebe), intercalados com o fungicida propinebe, foram pulverizados durante os experimentos, compondo o manejo 1 (M_1), M_2 , M_3 , e M_4 , respectivamente. Os manejos foram comparados com o tratamento testemunha que não recebeu nenhum produto. Além das pulverizações convencionais (600 L ha^{-1}) o biofungicida e o mancozebe também foram aplicados de forma eletrostática (360 L ha^{-1}). O progresso temporal da MFG foi avaliado e a cobertura das pulverizações foi verificada por meio de papéis hidrossensíveis. Na A_{in} , o M_1 , M_2 , M_3 e M_4 proporcionaram menor severidade em relação testemunha e na A_{n-in} , o M_1 e M_4 atrasaram a queda de folhas. A pulverização eletrostática foi semelhante a convencional nas variáveis e parâmetros epidemiológicos relativos ao progresso temporal da MFG. A cobertura das plantas da pulverização eletrostática com 360 L ha^{-1} foi menor que a pulverização convencional com 600 L ha^{-1} . Diferentes volumes de calda para a pulverização eletrostática podem ser considerados para aumentar a cobertura das plantas. O produto tecnológico 1, composto pela bactéria *B. alcalophilus*, pode ser recomendado para o manejo integrado da MFG.

Palavras-chave: *Colletotrichum* spp; *Malus domestica*; controle; tecnologia de aplicação.

1. Introdução

A mancha foliar de *Glomerella* (MFG) em macieira é ocasionada por várias espécies de *Colletotrichum* (Moreira et al., 2019). Alta incidência da doença é verificada em regiões de clima subtropical úmido como nos Estados Unidos (González et al., 2006), China (Wang et al., 2012) e Brasil (Becker et al., 2000). Nesta condição climática favorável ao desenvolvimento do patógeno, a doença pode atingir altas severidades e ocasionar a desfolha precoce (Katsurayama e Boneti, 2009). Produtores do Paraná relatam que as plantas tornam-se enfraquecidas e com menor produção no decorrer do tempo em pomares com incidência da MFG.

O controle da doença é realizado principalmente com fungicidas protetores pertencentes ao grupo dos ditiocarbamatos (mancozebe, metiram e propinebe) (Katsurayama e Boneti, 2009). Estes produtos são aplicados desde a brotação em setembro até a queda de folhas em abril no Paraná, para proteger os pomares durante todo o ciclo vegetativo e evitar o enfraquecimento das plantas. Porém, o período de carência destes fungicidas, isto é, intervalo de tempo exigido entre a aplicação e a colheita de frutos, acarreta na suspensão dos produtos durante um período entre janeiro e fevereiro. Esse período geralmente coincide com a ocorrência de condições climáticas favoráveis para a MFG no estado, acarretando em incrementos de severidade (Hamada, 2013) e deixando os pomares em alta pressão de inoculo (Kowata et al., 2010).

Além disso, o uso intensivo de fungicidas, especialmente em condições de alta pressão de inoculo, pode levar a seleção de populações resistentes ao patógeno. A redução de sensibilidade de isolados de *Colletotrichum* spp. associados a MFG já foi relatada para os fungicidas benomyl (Hamada et al., 2009), tiofanato metílico e mancozebe (Moreira et al., 2017) apesar deste último ser classificado como baixo risco de resistência segundo o ‘Comite de Ação a Resistência a Fungicidas’ (FRAC).

Assim, novos produtos são necessários para integrar o manejo da MFG. Antagonistas biológicos e substâncias extraídas de plantas são opções que têm sido estudadas para doenças foliares (Bautista-Baños et al., 2006; Rohini et al., 2016; Gadhi et al., 2018; Baiyee et al., 2019) e para doenças na pós-colheita de frutos (Fu et al., 2010; Demerutis, et al., 2008). Para o controle da MFG, agentes biológicos como *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus* spp. e *Pseudomonas putida* (Moreira et al., 2014) e substâncias como eugenol, isoeugenol, timol e carvacrol (Schorr, 2018) apresentaram resultados promissores em laboratório. Entretanto, antes de serem recomendados para os produtores há necessidade de teste em campo, visto que em condições naturais o controle pode ser reduzido pela ação da chuva (Wei et al., 2016), radiação, oscilações de temperatura (Stockwell et al., 1998) e por falhas na cobertura das plantas (Moreira e May De Mio, 2015). As bactérias com potencial de ação contra *Colletotrichum* associadas a MFG *in vitro* (Moreira et al., 2014) por exemplo, falharam no controle da doença quando aplicadas semanalmente durante o ciclo vegetativo de macieiras em pomar comercial (Moreira e May De Mio, 2015).

A formulação dos antagonistas biológicos e substâncias de óleos essenciais com adjuvantes é uma opção para melhorar a eficiência dos produtos em campo. Adjuvantes são utilizados em mistura com produtos químicos para melhorar a cobertura das plantas (Elmer

E Köhl, 1998), o que pode refletir em maior eficiência no controle (Gent et al., 2003; Zyl et al., 2010). Em conjunto com agentes biológicos, os adjuvantes também podem garantir a sobrevivência do micro-organismo no campo durante mais tempo e reduzir quantidade da doença, como relatado em estudo com formulações da estirpe *Candida sake* CPA-1 no biocontrole de *Botrytis cinerea* em uva (Cañamás et al., 2011).

Além das formulações, tecnologias de aplicação adequadas também pode contribuir com o controle da doença. Pulverizações eficientes são aquelas que protegem todas as partes da planta que são importantes para o desenvolvimento da doença. Por exemplo, em sigatoka negra da bananeira, a infecção ocorre majoritariamente na superfície adaxial das folhas, e por isso o controle com o fungicida de contato clorotalonil é eficiente somente quando o mesmo atinge esta região foliar (Washington et al., 1998). Em MFG, sabe-se que maior quantidade da doença ocorre no terço superior da copa (Hamada, 2013) e que a germinação de conídios ocorre nas duas superfícies da folha, mas é maior na superfície abaxial (Moreira e May de Mio, 2015). Possivelmente, a pulverização convencionalmente utilizada pelos produtores proporciona pouca ou nenhuma deposição de produto na região alta e na superfície abaxial das folhas. Em caquizeiro, por exemplo, pulverizações de volumes de calda superiores a 1000 L ha⁻¹ proporcionaram somente 10% de cobertura na superfície abaxial (Higashibara et al., 2012). Nesse contexto, a pulverização eletrostática é uma opção para otimizar a cobertura das plantas. Nesta tecnologia as gotas são liberadas do pulverizador após uma transformação elétrica que as deixa com carga oposta ao da superfície das folhas. Assim, as gotas tornam-se atraídas pelas folhas e partes da planta dificilmente atingidas pela convencional podem ficar protegidas mesmo com redução do volume de calda (Chaim, 2007).

Assim, este trabalho objetivou: I) estudar pesticidas biológicos que tiveram atividade na redução do crescimento micelial e germinação de conídios, em manejos integrados com fungicidas para controle da MFG e; II) avaliar a tecnologia de aplicação eletrostática para um biofungicida e um produto químico como alternativa para aumentar a cobertura das plantas e reduzir o volume de calda para o controle da doença.

2. Material e métodos

2.1. Pesticidas biológicos no manejo da MFG

2.1.1. Experimentos conduzidos em campo

2.1.1.1. Áreas experimentais

Dois pomares foram selecionados para condução dos experimentos. Em um dos pomares a MFG ocorreu por inoculação artificial do patógeno (Área Inoculada – A_{in}), devido à baixa pressão de inóculo na região em que o pomar estava localizado. No outro pomar, a doença ocorreu a partir de inóculo natural presente na região (Área não-Inoculada – A_{n-in}), visto que na estação de crescimento anterior ao experimento foram verificados sintomas severos da doença na área.

A A_{in} foi situada em pomar experimental em Curitiba (25°24'45.0"S, 49°14'50.7"W e altitude média de 935 m). O experimento utilizou uma área de 56,3 m² do pomar onde estavam dispostas sete linhas com as cultivares Eva e Gala intercaladas. Para o estudo foram utilizadas somente as plantas da 'Gala', a qual apresenta alta suscetibilidade a MFG. As plantas tinham três anos de idade conduzidas em líder central em sistema livre, plantadas num espaçamento 0,5 m x 1,5 m, sob porta-enxerto de Maruba e filtro de M9. A unidade experimental foi composta por uma planta nesta área.

A inoculação nesta área foi realizada no dia 12/12/2017 em todas as plantas da cultivar Gala. Dois ramos-do-ano por árvore foram selecionados na altura média da copa, sendo um no lado norte e outro no lado sul das plantas. Os ramos direcionados para o norte foram inoculados com o isolado monospórico da espécie *C. fructicola* (Cf) (M08-01) e os direcionados para o sul, com isolado monospórico de *C. nymphaeae* (Cn) (M10-01). Estas espécies foram escolhidas por serem as mais frequentes associadas a MFG nas regiões produtoras brasileiras (Moreira et al., 2019).

Para o preparo do inóculo, os isolados das espécies foram mantidos em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-ágar (BDA) durante seis dias. A partir dos conídios produzidos nas colônias, suspensões com concentração ajustada a 1x10⁴ conídios ml⁻¹ foram obtidas. Utilizando um borrifador, cada ramo recebeu 150ml da suspensão. Após

a inoculação, os ramos foram envoltos com sacos plásticos transparentes para manutenção da umidade durante 24 horas. Para garantir a ausência de doenças até o início do experimento, entre o outubro e novembro de 2017, o pomar recebeu duas pulverizações com o fungicida propinebe (Antracol® -Bayer Cropscience Ltda).

A A_{n-in} estava localizada em um pomar experimental no município de Fazenda Rio Grande (25°39'19.5"S, 49°16'34.7"W e altitude média de 895 m). A área experimental dentro do pomar tinha 276 m², onde estavam dispostas três linhas com plantas da cultivar Gala, sob o porta-enxerto de Maruba, com quatro anos de idade. As plantas foram conduzidas em líder central em sistema livre, com espaçamento de 1,5 m x 4 m. A unidade experimental foi composta por duas plantas nesta área.

Segundo a classificação de Köppen, os dois pomares situavam-se em regiões cujo o clima é caracterizado como Cfb, sendo temperado quente, com precipitação em todos os meses do ano e sem estação seca definida.

2.1.1.2. Descrição dos tratamentos

Os produtos avaliados nas áreas experimentais foram o produto tecnológico 1 (Pt₁), produto tecnológico 2 (Pt₂), um biofungicida e um padrão químico. O Pt₁ consistiu em uma mistura de *B. alcalophilus* (C12) e um adjuvante. Para o seu preparo, suspensões bacterianas foram obtidas conforme metodologia descrita por Moreira et al. (2014). As concentrações das suspensões foram identificadas em espectrofotômetro e diluídas em água até chegarem a 2,5x10⁵ UFC ml⁻¹ (12x10¹⁰ UFC ha⁻¹), concentração na qual foi verificada a máxima inibição do crescimento micelial de isolados do complexo *C. acutatum* pelo agente biológico em questão (Moreira et al., 2014). Após isto, um adjuvante, o qual não pode ser descrito para proteger o produto, fornecido pelo Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais (LEQSIN) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), foi adicionado à calda.

O Pt₂ consistiu em uma formulação de compostos naturais extraídos de frutas cítricas, desenvolvido pelo Leqsin. Para o seu uso nos ensaios, o produto concentrado foi diluído em água até 500 mg L⁻¹ (300 g ha⁻¹) para o composto suposto como de maior fungitoxicidade da mistura. Nesta concentração, o produto reduziu a severidade da MFG em folhas inoculadas em um experimento exploratório.

O biofungicida foi composto pelo produto registrado a base de *B. subtilis* (isolado QST713) (Serenade®), adicionado de um espalhante (Hoefix® a 0,2%). O produto foi pulverizado em concentração de 4 L ha⁻¹, conforme recomendação do fabricante (Bayer Cropscience Ltda). O mancozebe representou o padrão químico, pois é um produto amplamente utilizado pelos produtores, especialmente em momentos de alta pressão de inóculo (Katsurayama e Boneti, 2009). O mancozebe (Manzate WG®) (Antracol®) foi aplicado em concentração de 1,2 kg ha⁻¹ conforme recomendação do fabricante (UPL S.A., Bayer Crop Science S.A.). Na A_{in}, as aplicações foram realizadas com o pulverizador costal Guarany® com capacidade de 5L e na A_{n-in} com o pulverizador costal KAWASHIMA (KWS 2625) com capacidade de 20L. Todos os produtos foram pulverizados em um volume de calda de 600 L ha⁻¹. Os produtores de maçã usualmente adotam 1000 a 1500 L ha⁻¹ para pulverizações com fungicidas, mas as plantas utilizadas para o experimento apresentavam porte pequeno (3 a 4 anos de idade) e o jato de calda foi direcionado apenas para o centro das parcelas para evitar contaminação, reduzindo o volume necessário para o experimento.

Em cada área experimental, os produtos descritos foram pulverizados intercalados com o fungicida protetor propinebe (1,2 kg ha⁻¹ - Bayer S.A). Este fungicida também foi incluído nos manejos, pois foi considerado que somente a aplicação de pesticidas biológicos durante o ciclo da cultura podem não resultar em controle eficiente da doença, conforme verificado em experimentos prévios (Moreira et al. 2015). A sequência de pulverizações constituíramos manejos para controle da MFG (tratamentos) (Tabela 1). Assim, além do propinebe, o manejo 1 (M₁) teve aplicações do Pt₁; o manejo 2 (M₂) recebeu pulverizações do Pt₂ e; o manejo 3 (M₃) teve aplicações de Biofungicida e o manejo 4, (M₄), alternados o fungicida mancozebe e o propinebe, simulando o controle da MFG em pomares comerciais. Cada manejo foi comparado com o tratamento testemunha (T), sem aplicação de produtos.

Na A_{in}, as aplicações foram realizadas em intervalos de 15 dias, desde 11/12/2017 (dia anterior a inoculação) até 13/01/2018, totalizando três aplicações (duas com pesticida biológico/mancozebe e uma com propinebe). Nesta área, o experimento foi finalizado antes do período de colheita. Na A_{n-in} as aplicações foram semanais, desde 29/09/2017 até 09/03/2018. A colheita ocorreu em dois momentos, em razão da maturação desuniforme dos frutos. Assim, devido ao período de carência descrito pelo fabricante dos fungicidas (UPL S.A., Bayer Crop Science S.A.), nesta área, o propinebe e mancozebe não foram pulverizados de 19/01/2018 a 06/02/2018. Desta forma, o M₁, M₂ e M₃ tiveram um total de 23 aplicações (12 com pesticidabiológico/mancozebe e 11 com propinebe) e o M₄ um total

de 21 (10 mancozebe e 11 propinebe). Nas duas áreas foram considerados delineamentos em blocos ao acaso com 5 tratamentos (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , e T) e 4 repetições.

Tabela 1

Descrição dos tratamentos do experimento Pesticidas biológicos no manejo da mancha foliar de *Glomerella* conduzidos na área inoculada (A_{in}) e área não inoculada (A_{n-in}).

Tratamentos	Descrição	A_{in}		
		Intervalo	Período da colheita	n° pulv.
M_1^a	Aplicações intercaladas de Pt_1^f e propinebe	quinzenal	-	3
M_2^b	Aplicações intercaladas de Pt_2^g e propinebe	quinzenal	-	3
M_3^c	Aplicações intercaladas de biofungicida e propinebe	quinzenal	-	3
M_4^d	Aplicações intercaladas de mancozebe e propinebe	quinzenal	-	3
T ^e	Nenhum produto	-	-	0
		A_{n-in}		
M_1^a	Aplicações intercaladas de Pt_1^f e propinebe	semanal	Pt_1 a cada 15 dias	23
M_2^b	Aplicações intercaladas de Pt_2^g e propinebe	semanal	Pt_2 a cada 15 dias	23
M_3^c	Aplicações intercaladas de biofungicida e propinebe	semanal	Biofun. a cada 15 dias	23
M_4^d	Aplicações intercaladas de mancozebe e propinebe	semanal	Nenhum produto	21
T ^e	Nenhum produto	-	-	0

^a Manejo 1; ^b manejo 2; ^c manejo 3; ^d manejo 4; ^e testemunha; ^f produto tecnológico 1 (formulação de *Bacillus alcalophilus*); ^g produto tecnológico 2 (formulação de extratos naturais).

2.1.1.3. Avaliação da doença

O progresso temporal da MFG foi acompanhado em folhas de ramos selecionados e de amostragens destrutivas. A avaliação em folhas de ramos selecionados foi realizada nas duas áreas experimentais. Na A_{in} , estas avaliações foram semanais, iniciando um dia após a inoculação (13/12/2017) até o dia 01/02/2018 (totalizando oito avaliações), nos mesmos ramos que foram inoculados. Na A_{n-in} , as avaliações foram realizadas durante todo o ciclo vegetativo, quinzenalmente, a partir de 24/11/2017 até 23/03/2018 (totalizando 12 avaliações). Neste caso, foi escolhido um ramo-do-ano por repetição no período de expansão foliar, seguindo os critérios de altura aproximada de 1,5 m acima do solo (terço médio da copa) e direcionados para a entrelinha. Nas duas áreas, fitilhos foram amarrados na posição abaixo da décima folha a partir do ápice para identificar as folhas. As 10 folhas a partir do

fitilho foram avaliadas. Dados de incidência, do número de folhas, e da severidade, estimada com auxílio de escala diagramática desenvolvida para este patossistema (Moreira et al., 2018) foram obtidos. Para cada ramo, médias dos dados das 10 folhas foram calculadas.

A avaliação em folhas de amostragens destrutivas foi realizada somente na A_{n-in} durante os meses onde geralmente ocorrem condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença (Hamada, 2013). Em janeiro (23/01/2018), fevereiro (24/02/2018) e março (23/03/2018) foram coletadas 10 folhas das seguintes alturas da copa em cada repetição: terço inferior (até 1,5 m), médio (1,5 m a 1,9 m) e superior (acima de 1,9 m). Dados de severidade, estimados também com auxílio de escala diagramática relativa a MFG (Moreira et al., 2018) foram obtidos nestas avaliações. Médias da severidade das 10 folhas avaliadas foram calculadas para cada repetição e altura.

Na A_{n-in} , nas mesmas datas das avaliações de folhas em amostragens destrutivas também foi obtido o índice de área foliar (IAF), razão entre a área foliar do dossel e a unidade de superfície projetada no solo (m^2/m^2). Este dado foi coletado para avaliar a redução do índice ao longo do tempo, representando a desfolha. Para isso, o equipamento ceptômetro (OccuPAR lp-80) foi utilizado. Nas avaliações, o sensor luminoso era posicionado ao pleno sol e na sequência disposto abaixo da copa das árvores (aproximadamente 50 cm acima do solo). Com base na diferença de radiação, o IAF foi automaticamente calculado. Foram realizadas 3 leituras para compor a média de cada repetição.

2.1.2. Concentração mínima inibitória dos produtos

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada para *C. nymphaeae* e *C. fructicola*, utilizando os isolados M10-01 e M08-01 e os produtos Pt₁, Pt₂, biofungicida e mancozebe.

A CMI foi determinada por meio do método da microdiluição padronizado pelo ‘National Committee for Clinical Laboratory Standards’ (NCCLS) (2002), com algumas adaptações. Este método utiliza microplacas de ELISA contendo 96 células. A CMI é determinada com base na absorbância do conteúdo das células da microplaca, obtida em espectrofotômetro. Assim, a microplaca foi dividida em regiões A, B, C e D. Na célula ‘A’ da microplaca (1 célula) foi adicionado somente água; na região ‘B’ (7 células), água em

conjunto com inóculo; na 'C' (22 células) somente meio de cultura Batata-Dextrose e; na 'D' (66 células) os produtos em diferentes gradientes de concentração juntamente com o inóculo no meio de cultura líquido. A região 'D' continha 6 concentrações para cada produto em três repetições. As concentrações foram de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , $1,5 \times 10^5$, $1,7 \times 10^5$, $2,5 \times 10^5$ UFC ml^{-1} para Pt₁; 100, 200, 300, 400, 500, 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para Pt₂; 10, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{L ml}^{-1}$ para biofungicida e 5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para o mancozebe. O inóculo foi preparado a partir de conídios produzidos em colônias dos isolados com seis dias de idade. Suspensões de conídios foram produzidas em meio de cultura Batata-Dextrose (BD) adicionadas nas células da microplaca para obter a concentração de 10^5 conídios ml^{-1} . Após o preparo das placas, a primeira mensuração em espectrofotômetro (630 nm) foi realizada para detectar possíveis influências dos produtos e dos conídios não germinados nos valores de absorbância. As microplacas foram incubadas durante 48 horas sob fotoperíodo de 12 horas a 25°C, e então uma nova mensuração foi realizada para detectar a influência da germinação de conídios na absorbância. .

Para determinar a CMI, primeiramente foi isolado o valor de absorbância da germinação de conídios segundo a seguinte equação: Absorbância da germinação de conídios em cada célula da região 'D' ($DF_{n,x}$) = ($D2_{n,x} - C2 - A2$) - ($D1_{n,x} - C1 - A1$), em que 'A' e 'C' correspondem a média dos valores de absorbância destas regiões da microplaca; ' $D_{n,x}$ ' o valor de absorbância de cada célula da região 'D' identificada por suas coordenadas; '1' valores correspondente a primeira mensuração e '2' valores correspondentes a segunda mensuração. Após isso, a porcentagem de inibição foi calculada para cada célula segundo a formula: $\%IN_{n,x} = (DF_{n,x} \cdot 100 / B2) - 100$, em que ' $DF_{n,x}$ ' corresponde a absorbância da germinação de conídios em cada célula da região 'D' e ' $B2$ ' a média da absorbância da região 'B' na segunda mensuração. A CMI foi determinada quando houveram porcentagens de inibição (%IN) acima de 98%.

2.2. Pulverização eletrostática no manejo da MFG

2.2.1. Descrição do experimento

O desempenho da pulverização eletrostática no controle da MFG foi avaliado comparando manejos que incluíram a pulverização do biofungicida e do mancozebe de

forma convencional (sem eletrização de gotas) e eletrostática. O experimento foi realizado nas mesmas áreas descritas do experimento ‘Pesticidas biológicos e botânicos no manejo da MFG’ (Seção 2.1.1.1.). Os tratamentos M₃ e M₄ desse experimento (descritos na seção 2.1.1.2.) corresponderam, respectivamente, ao manejo convencional com biofungicida (M_bC) e manejo convencional com mancozebe (M_mC). Os tratamentos eletrostáticos tiveram a mesma frequências e datas de aplicação que o M_bC e M_mC, mas, o biofungicida e o mancozebe foram aplicados com um pulverizador eletrostático (Jetbras®), compondo o manejo com biofungicida eletrostático (M_bE) e manejo com mancozebe eletrostático (M_mE). Nos tratamentos M_mE e bem, o mancozebe e o biofungicida foram aplicados em um volume de calda de 360 L ha⁻¹ (60% da pulverização convencional), com concentrações de 3,3 g L⁻¹ e 11,1 ml L⁻¹, respectivamente, para manter a mesma quantidade de produto por unidade de área dos tratamentos convencionais (Tabela 2).

A avaliação do progresso temporal da doença foi realizada como descrito na Seção 2.1.1.3.. Para explorar os dados com mais detalhes, os manejos com cada produto foram analisados separadamente. Assim, as análises do biofungicida e do mancozebe seguiram um delineamento em blocos ao acaso, com dois tratamentos (convencional e eletrostático) e quatro repetições.

Tabela 2.

Descrição dos tratamentos e, volume de calda e concentração do biofungicida e do mancozebe do experimento da pulverização eletrostática no manejo da mancha foliar de *Glomerella*.

Tratamento	Descrição	Vol. de calda ^a	Concentração na calda	Quantidade de produto
M _m C	Pulv. convencional de <u>mancozebe</u> intercalada com propinebe	600 L ha ⁻¹	2,0 g L ⁻¹	0,72 g planta ⁻¹
M _m E	Pulv. eletrostática de <u>mancozebe</u> intercalada com propinebe	360 L ha ⁻¹	3,3 g L ⁻¹	0,72 g planta ⁻¹
M _b C	Pulv. convencional de <u>biofungicida</u> intercalada com propinebe	600 L ha ⁻¹	6,6 ml L ⁻¹	2,4 ml planta ⁻¹
M _b E	Pulv. eletrostática de <u>biofungicida</u> intercalada com propinebe	360 L ha ⁻¹	11,1 ml L ⁻¹	2,4 ml planta ⁻¹

^{a,b} correspondem, respectivamente, ao volume de calda e concentração dos produtos que estão sublinhados na descrição dos tratamentos.

2.2.2. Cobertura das plantas pelas pulverizações

A cobertura das plantas pelas pulverizações foi avaliada em dois experimentos. O primeiro comparou a cobertura das pulverizações do mancozebe dos dias 06/02/2018 e 23/02/2018 nos tratamentos M_mC e M_mE na A_{n-in}. Considerando que, diferentes volumes de

calda podem resultar em diferentes coberturas das plantas, o segundo experimento foi efetuado com os tratamentos de pulverização do produto mancozebe na forma convencional em 600 L ha^{-1} e, na forma eletrostática com 360 L ha^{-1} , 480 L ha^{-1} e 580 L ha^{-1} . Este ensaio foi executado na estação vegetativa subsequente aos ensaios da ‘Pulverização eletrostática no manejo da MFG’ na data de 26/11/18 no mesmo local onde se situou a A_{n-in} . Nos dois experimentos, antes das pulverizações, papéis hidrossensíveis (Micron) foram grampeados na superfície adaxial e abaxial das folhas na porção inferior (até 1,5 m acima do solo) e superior (acima de 1,9 m) da copa das plantas. Após a pulverização, os papéis foram recolhidos, escaneados e no software ‘Quanti’ foi determinada a porcentagem de área coberta em cada um dos tratamentos. O delineamento dos dois experimentos foi em blocos ao acaso com 4 repetições.

2.3. Cálculo de variáveis epidemiológicas e análise de dados

Variáveis e parâmetros epidemiológicos foram obtidos para os experimentos de campo de ‘Pesticidas biológicos e botânico no manejo da MFG’ com base nos dados coletados de folhas em ramos identificados. Em avaliações de amostragens destrutivas para este experimento foi calculada somente a média em cada altura para comparação entre tratamentos. A incidência final foi calculada por meio da porcentagem do número de folhas doentes, sendo considerada como doente aquela que na avaliação anterior a sua queda apresentou sintomas. Posteriormente, foi calculado o tempo para atingir 50% (t_{50}) e 100% (t_{100}) da incidência final nos tratamentos.

Com os dados de severidade foram calculadas a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPd), segundo a fórmula: $AACPd = \sum_{i=1}^{n-1} [(x_i + x_{i+1})]/2 (t_{i+1} - t_i)$, sendo “n” o número de avaliações, “x” a severidade da doença e “ $(t_{i+1} - t_i)$ ” o intervalo de tempo entre duas avaliações consecutivas (Shaner e Finney, 1977). Foram considerados dois tempos finais para o cálculo da variável. O primeiro tempo final foi de 10/01/2018 na A_{n-in} e de 13/01/2018 na A_{in} , caracterizando a área abaixo da curva de progresso da doença na colheita (AACPd_c). Estas datas foram definidas por serem anteriores ao período de colheita e não serem observados a queda de folhas. Para o segundo tempo final, a última data de avaliação da folha antes da sua queda foi considerada, caracterizando a AACPd final (AACPd_f). Neste

caso, não foi pré-estabelecida uma data para todas as folhas do experimento, pois o dia da queda não foi homogêneo entre os ramos avaliados.

A partir destes dados de severidade também foi realizada a modelagem da epidemia no software R. A severidade foi ajustada ao modelo exponencial misto com efeitos aleatórios no parâmetro de taxa de progresso da doença, pois foi considerado que ocorre variabilidade entre as unidades experimentais de um mesmo tratamento. Apesar de algumas curvas de progresso da doença também se ajustarem ao modelo logístico, a maioria teve comportamento exponencial e foi escolhido este modelo para ser possível comparar os parâmetros entre tratamentos. O modelo exponencial é representado pela equação $Y=y_0*\exp(-rt)$, em que Y é a severidade da doença, y_0 é o parâmetro relacionado ao inóculo inicial, r se relaciona a taxa de progresso da doença e t é o tempo em dias após a primeira avaliação. Para cada tratamento os parâmetros y_0 e r , foram utilizados para as comparações.

Com base no número de folhas em cada avaliação, áreas abaixo da curva de redução do número de folhas (AACRnf) foram obtidas seguindo a mesma formula a AACPd, porém substituindo-se os dados de severidade pelo número de folhas em cada avaliação. Além disso, para agrupar o dano da desfolha e da severidade em um só índice, valores de área sadia foram calculados em cada data de avaliação. A área sadia foi determinada pela subtração: 'as' = 100% – severidade (%) quando a folha ainda estava aderida ao ramo. A partir do momento da sua queda a contribuição para o índice foi igual a zero. Com os valores obtidos, curvas da redução da área sadia (CRas) foram geradas para cada tratamento e as áreas abaixo da CRas (AACRas) foram calculadas. Para isso, a formula de AACPd foi utilizada, mas os dados de severidade da formula foram substituídos pela área sadia calculada.

No experimento relativo a 'pulverização eletrostática no manejo da MFG', com os dados obtidos em folhas de ramos selecionados foram calculadas as variáveis de incidência final, t_{50} , e t_{100} , e estimados os parâmetros epidemiológicos relativos ao inóculo inicial (y_0) e taxa de progresso da doença (r), da mesma forma que para o experimento dos 'Pesticidas biológicos e botânico no manejo da MFG'. Com os dados de severidade de folhas em amostragens destrutivas foi obtida a área abaixo da curva de progresso da doença relativa (AACpd_r) para cada altura e tratamento. A variável foi calculada obtendo a AACpd segundo a fórmula descrita anteriormente (Shaner e Finney, 1977) e dividindo a mesma pelo número de dias avaliados em que ocorreu a doença.

A existência de diferenças entre os tratamentos nos experimentos foi verificada por meio da análise de Variância e teste-F a 5% de probabilidade. Gráficos diagnóstico foram inspecionados para avaliar os pressupostos necessários da análise de variância. Quando necessário, a transformação de dados foi utilizada para reduzir os desvios dos pressupostos. Em caso de resultados significativos na análise de variância, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Estas análises foram efetuadas no Software R (R Core Team, 2017).

3. Resultados

3.1. *Pesticidas biológicos e botânico no manejo da MFG*

3.1.1. *Influência de manejos no progresso temporal da doença na A_{in}*

As médias das variáveis e parâmetros epidemiológicos do progresso temporal da MFG nos tratamentos na A_{in} estão expostos na Tabela 3. A área abaixo da curva de progresso da doença na colheita ($AACP_d_c$) dos tratamentos M_1 (20,6), M_2 (17,4), M_3 (1,3) e M_4 (4,3) foram menores do que na testemunha (78,8) em folhas inoculadas com *C. nymphaeae*. O inoculo inicial (y_0) proporcionado pelo M_1 (0,38), M_2 (0,45) e M_3 (0,32) foram menores ao tratamento testemunha (1,27) e semelhantes ao M_4 (0,08), que incluiu o padrão químico mancozebe. No parâmetro estimado relacionado a taxa de progresso da doença (r) não houveram diferenças significativas entre nenhum tratamento.

Tabela 3

Variáveis epidemiológicas e parâmetros estimados do progresso temporal da mancha foliar de *Glomerella* nos tratamentos em área inoculada com as espécies *Colletotrichum nymphaeae* e *C. fruticola*, Curitiba, Paraná, Brasil.

Espécie / tratamento	Variáveis epidemiológicas						Parâmetros estimados	
	Inc ^f	t ₅₀ ^g	t ₁₀₀ ^h	AACPd _c ⁱ	AACPd _r ^j	AACRn _f ^k	r ^l	y ₀ ^m
<i>C. nymphaeae</i>								
M ₁ ^a	100,0 b ²	28,2 ab	34,2 b	20,6 a	95,9 b	442,5 ab	3,1 ns ^l	0,38 a
M ₂ ^b	97,5 b	29,5 ab	40,0 a	17,4 a	61,3 b	445,0 ab	2,7	0,45 a
M ₃ ^c	100,0 b	26,3 ab	45,0 a	10,3 a	63,6 b	442,5 ab	3,1	0,32 a
M ₄ ^d	62,5 a	42,5 a	50,0 a	4,3 a	18,8 a	468,1 a	2,8	0,08 a
T ^e	90,0 b	21,7 b	31,7 b	78,8 b	157,0 b	372,7 b	3,1	1,27 b
<i>C. fruticola</i>								
M ₁ ^a	73,3 ab	31,0 ns	48,3 ab	11,2 ab	44,1 a	458,3 ns	1,9 ns	0,41 a
M ₂ ^b	92,5 ab	17,5	37,5 ab	22,9 ab	110,4 b	442,0	3,0	0,36 a
M ₃ ^c	82,5 ab	22,0	45,0 ab	11,0 ab	50,8 ab	456,9	2,8	0,19 a
M ₄ ^d	60,0 a	28,7	50,0 a	8,2 a	33,9 a	458,7	3,0	0,11 a
T ^e	100,0 b	18,5	35,0 b	37,7 b	132,1 b	411,1	2,5	0,78 b

^a Manejo 1 (sequência de aplicações intercaladas do produto tecnológico 1, formulado de *Bacillus alcalophilus*, com propinebe); ^b manejo 2 (sequência de aplicações intercalada do produto tecnológico 2, formulado de extratos naturais, com propinebe); ^c manejo 3 (sequência de aplicações intercaladas de produto a base de *B. subtilis*, com propinebe); ^d manejo 4 (sequência de aplicações intercaladas de mancozebe e propinebe); ^e testemunha (nenhuma aplicação). ^f Incidência final; ^g tempo para atingir 50% da incidência final em dias após a plena floração; ^h tempo para atingir 100% da incidência final em dias após a plena floração; ⁱ área abaixo da curva de progresso da doença na colheita; ^j área abaixo da curva de progresso da doença final; ^k área abaixo da curva de redução do número de folhas; ^l taxa de progresso da doença; ^m inóculo inicial. ¹ ns = diferenças não significativas no teste F a 5% de probabilidade. ² Médias seguidas pela mesma letra não diferem no Tukey a 5% de probabilidade.

As curvas de redução da área sadia (CDas) de folhas de ramos selecionados na A_{in}, as quais consideram a severidade e a queda de folhas, estão ilustradas na Fig. 1. Na A_{in}, a queda de folhas teve pouca influência na redução da área sadia, pois o experimento foi encerrado antes da abscisão de todas as folhas avaliados. Nas folhas de ramos inoculados com *C. nymphaeae*, a área abaixo da curva de redução da área sadia (AACRas) do M₁ (4310,7), M₂ (4381,4) e M₃ (4350,4) foram semelhantes ao M₄ (4662,2) e maiores que a testemunha (3488,2). Nas folhas dos ramos inoculados com *C. fruticola*, a área abaixo da curva de redução da área sadia (AACRas) do M₁ (4442,1) e M₃ (4424,3) foram semelhantes ao M₄ (4455,9025) e maiores que a testemunha (3381,9), enquanto o M₂ (4231,0), foi mais eficiente em relação à testemunha, mas menor que os demais tratamentos.

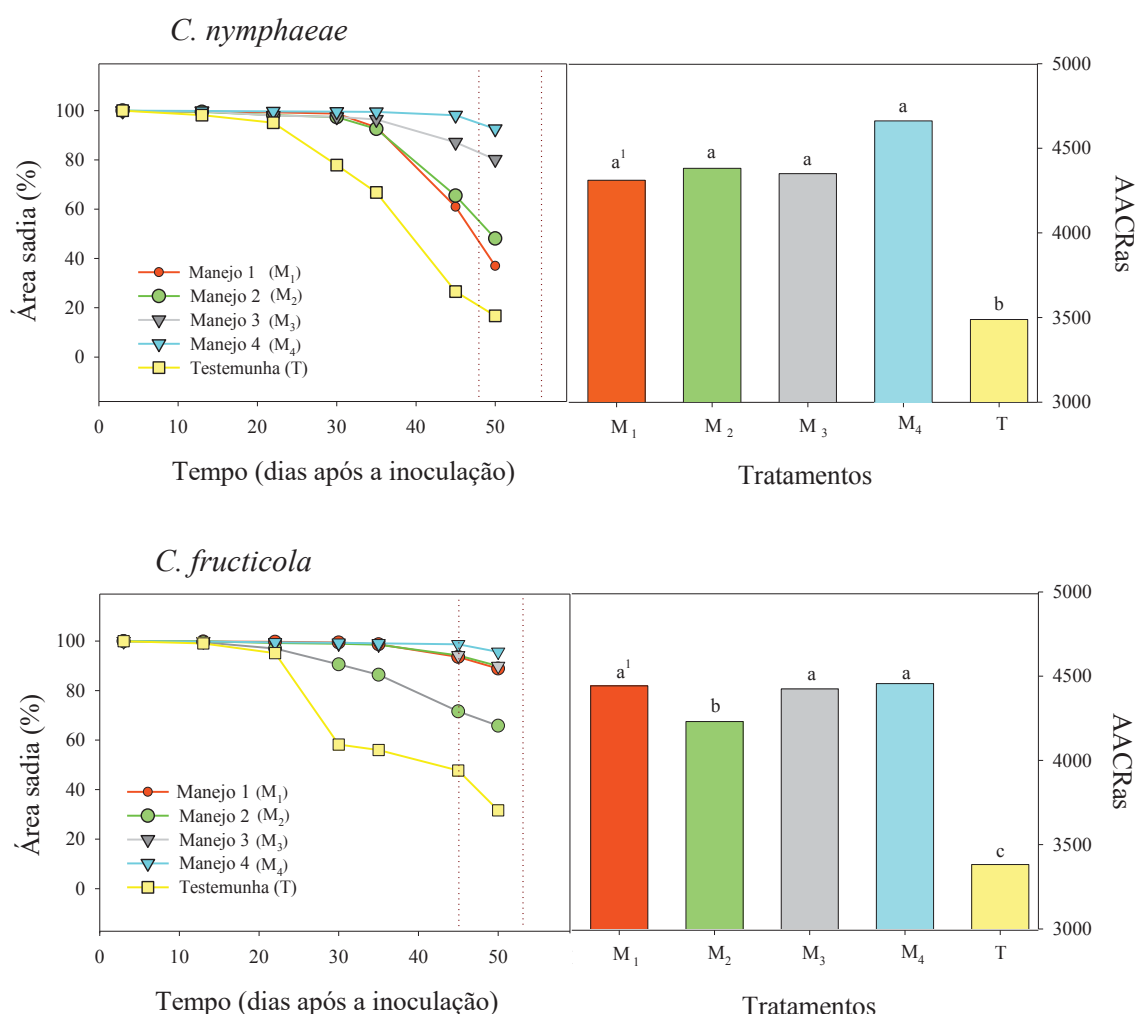


Fig. 1. Curvas de redução da área sadia (CRAs) de folhas de macieira em ramos inoculados com as espécies *Colletotrichum nymphaeae* e *C. fructicola*, causadoras da mancha foliar de Glomerella nos tratamentos em área experimental, Curitiba, Paraná, Brasil e área abaixo da CRAs (AACAs) correspondente. ¹Barras com a mesma letra não diferem no Tukey a 5% de probabilidade. Intervalo de tempo entre as linhas tracejada indica o período de colheita. ^a Manejo 1 (sequência de aplicações intercaladas do produto tecnológico 1, formulado de *Bacillus alcalophilus*, com propinebe); ^b manejo 2 (sequência de aplicações intercaladas do produto tecnológico 2, formulado de extratos naturais, com propinebe); ^c manejo 3 (sequência de aplicações intercaladas de produto a base de *B. subtilis*, com propinebe); ^d manejo 4 (sequência de aplicações intercaladas de mancozebe e propinebe)

3.1.2. Influencia de manejos no progresso temporal da doença na A_{n-in}

As médias das variáveis e parâmetros epidemiológicos do progresso temporal da MFG nos tratamentos na A_{n-in} estão expostos na Tabela 4. Diferenças estatísticas entre os manejos e a testemunha foram observadas somente na variável de área abaixo da curva de redução do número de folhas (AACRnf) e no parâmetro de taxa de progresso da doença (r). A AACRnf do M₁ (870,6) e M₄ (836,7) foram semelhantes e maiores que da testemunha

(755,2). A taxa (r) do M₁ (5,5), M₂ (5,7) e M₃ (5,3) foram menores que do M₄ (7,5) e da testemunha (10,2).

Tabela 4

Variáveis epidemiológicas e parâmetros estimados do progresso temporal da mancha foliar de *Glomerella* nos tratamentos em área onde a doença ocorreu por inoculo natural presente no pomar, Fazenda Rio Grande, Paraná, Brasil.

Tratamentos	Variáveis Epidemiológicas						Parâmetros estimados	
	Inc ^f	t ₅₀ ^g	t ₁₀₀ ^h	AACPd _c ⁱ	AACPd _f ^j	AACRn _f ^k	r ^l	y_0 ^m
M ₁ ^a	95,0 ns ¹	113,0 ns	132,0 ns	12,4 ns	117,0 ab ²	870,6 a	5,5 a	0,069 ns
M ₂ ^b	97,5	113,0	124,5	21,6	55,5 a	701,7 b	5,7 a	0,080
M ₃ ^c	90,0	113,0	126,7	15,7	91,2 ab	769,7 b	5,3 a	0,101
M ₄ ^d	96,2	118,6	139,7	9,7	156,2 b	836,7 a	7,4 b	0,020
T ^e	95,0	105,5	128,0	26,2	116,3 ab	755,2 b	10,2 b	0,004

^a Manejo 1 (sequência de aplicações intercaladas do produto tecnológico 1, formulado de *Bacillus alcalophilus*, com propinebe); ^b manejo 2 (sequência de aplicações intercalada do produto tecnológico 2, formulado de extratos naturais, com propinebe); ^c manejo 3 (sequência de aplicações intercaladas de produto a base de *B. subtilis*, com propinebe); ^d manejo 4 (sequência de aplicações intercaladas de mancozebe e propinebe); ^e testemunha (nenhuma aplicação). ^f Incidência final; ^g tempo para atingir 50% da incidência final em dias após a plena floração; ^h tempo para atingir 100% da incidência final em dias após a plena floração; ⁱ área abaixo da curva de progresso da doença na colheita; ^j área abaixo da curva de progresso da doença final; ^k área abaixo da curva de redução do número de folhas; ^l taxa de progresso da doença; ^m inóculo inicial. ¹ ns = diferenças não significativas no teste F a 5% de probabilidade. ² Médias seguidas pela mesma letra não diferem no Tukey a 5% de probabilidade.

As curvas de redução da área sadia de folhas, as quais consideram a severidade e a queda de folhas em folhas de ramos selecionados na A_{n-in} estão ilustradas na Fig. 2. Somente a área abaixo da curva de redução da área sadia (AACRas) do M₁ (8436,9) e M₄ (8328,5) foram maiores do que da testemunha (6267,8).

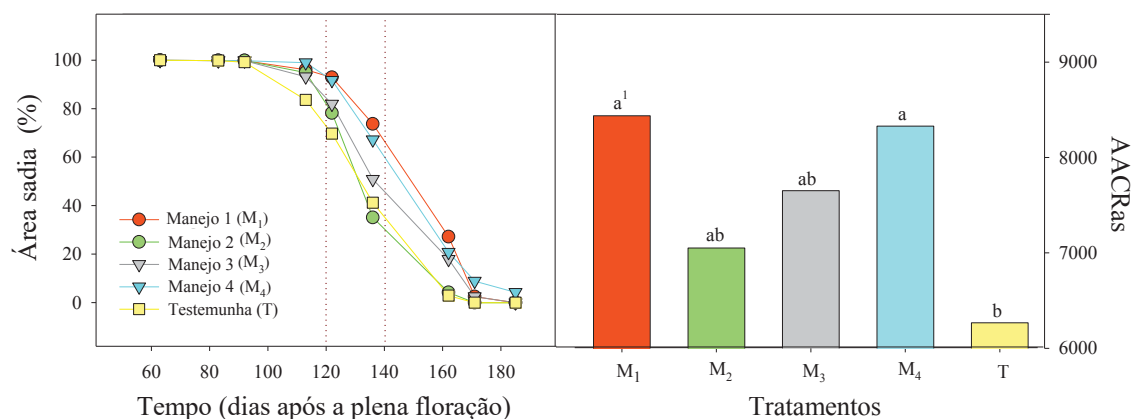


Fig. 2. Curvas de redução da área sadia (CRas) de folhas de ramos selecionados em área onde a mancha foliar de *Glomerella* ocorreu por inoculo natural presente no pomar, Fazenda Rio Grande, Paraná, Brasil e área abaixo da CRas (AACRas) correspondente. ²Barras com a mesma letra não diferem no Tukey a 5% de probabilidade. Intervalo de tempo entre as linhas tracejada indica o período de colheita. ^a Manejo 1 (sequência de aplicações intercaladas do produto tecnológico 1, formulado de *Bacillus alcalophilus*, com propinebe); ^b manejo 2 (sequência de aplicações intercalada do produto tecnológico 2, formulado de extratos naturais, com propinebe); ^c manejo 3 (sequência de aplicações intercaladas de produto a base de *B. subtilis*, com propinebe); ^d manejo 4 (sequência de aplicações intercaladas de mancozebe e propinebe).

As diferenças estatísticas entre a severidade média em folhas de amostragens destrutivas dos tratamentos foi a mesma no terço inferior, médio e superior da copa da planta. Assim, para simplificar a apresentação dos dados, na Fig. 3 somente os resultados de severidade do terço médio estão expostos e acompanhados do índice de área foliar. Na avaliação do mês de janeiro, realizada durante o período de colheita, a severidade média de folhas do M₄ (7,5%) foi menor do que de folhas da testemunha (12,2%). Na avaliação de fevereiro, a severidade não foi diferente entre os tratamentos. No ultimo mês de avaliação, nenhum produto foi diferente da testemunha. Comparando o mês de janeiro e março, a severidade médias dos tratamentos M₁, M₂, M₃ e testemunha reduziram, enquanto que a média do M₄ aumentou. O índice de área foliar (IAF) do M₄ foi maior que a testemunha em todos os meses de avaliação.

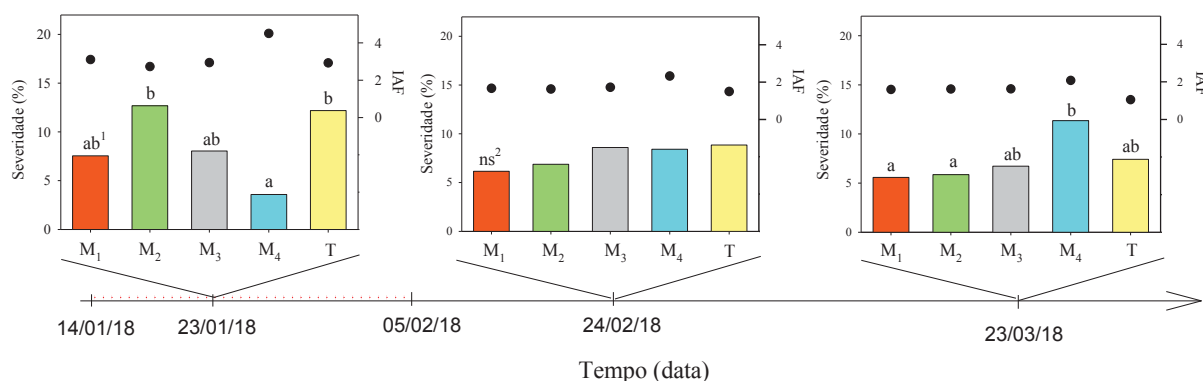


Fig. 3. Média da severidade de mancha foliar de *Glomerella* em folhas de macieira, cultivar Gala, obtidas por amostragens destrutivas em três datas de avaliação, nos tratamentos em área experimental com inoculo natural, Fazenda Rio Grande, Paraná, Brasil. Linha tracejada vermelha na linha do tempo indica o período de colheita. Pontos em preto representam o índice de área foliar (IAF) em cada tratamento. ¹Barras com a mesma letra não diferem no Tukey a 5% de probabilidade. ²ns = diferenças não significativas no teste F a 5% de probabilidade. ^a Manejo 1 (sequência de aplicações intercaladas do produto tecnológico 1, formulado de *Bacillus alcalophilus*, com propinebe); ^b manejo 2 (sequência de aplicações intercalada do produto tecnológico 2, formulado de extratos naturais, com propinebe); ^c manejo 3 (sequência de aplicações intercaladas de produto a base de *B. subtilis*, com propinebe); ^d manejo 4 (sequência de aplicações intercaladas de mancozebe e propinebe); e testemunha (sem aplicação).

3.1.3. Concentração mínima inibitória dos produtos

Os resultados referentes ao teste de concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos produtos e a sua comparação com a dose utilizada no experimento de campo estão expostos na Tabela 5. A CMI do Pt₁ foi diferente para as duas espécies avaliadas, sendo de 10×10^4 UFC ml⁻¹ para *C. nymphaeae* e de 1×10^4 UFC ml⁻¹ para *C. fructicola*. As duas concentrações ficaram abaixo da dose utilizada no campo de 20×10^4 UFC ml⁻¹. A CMI do biofungicida para as duas espécies de *Colletotrichum* avaliadas foi de 41×10^4 UFC ml⁻¹. Porém, observa-se que esta concentração foi maior do que a utilizada no campo (9×10^4 UFC ml⁻¹). De acordo com o teste, uma redução de 78% e 80% na germinação de conídios foi observada para *C. nymphaeae* e *C. fructicola*, respectivamente, na dose utilizada no campo. Não foi possível determinar a CMI do Pt₂ e do mancozebe pois, as doses do teste não contemplaram essa concentração. A CMI do Pt₂ foi menor que 100 µg ml⁻¹ pois, nesta concentração já havia 100% de inibição. A CMI do mancozebe foi maior que 50 µg ml⁻¹, pois nesta maior dose avaliada, somente 79,5% de redução na germinação de conídios de *C. nymphaeae* e 56% de *C. fructicola* foram observados.

Tabela 5

Concentração mínima inibitória de *C. nymphaeae* e *C. fructicola* pelos produtos e dose utilizada nos experimentos de campo.

Produto	Concentração mínima inibitória		Dose de campo
	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. fructicola</i>	
Pt ₁	10x10 ⁴ UFC ml ⁻¹	1x10 ⁴ UFC ml ⁻¹	20x10 ⁴ UFC ml ⁻¹
Pt ₂	≤ 100 µg ml ⁻¹	≤ 100 µg ml ⁻¹	500 mg L ⁻¹ (500 µg ml ⁻¹)
Biofungicida	30 µL ml ⁻¹ (41x10 ⁴ UFC ml ⁻¹)	30 µL ml ⁻¹ (41x10 ⁴ UFC ml ⁻¹)	4 L ha ⁻¹ (9x10 ⁴ UFC ml ⁻¹)
Mancozebe	> 50 µg ml ⁻¹	> 50 µg ml ⁻¹	1,2 kg ha ⁻¹ (2000µg ml ⁻¹)

^a Produto tecnológico 1 (formulação com ingrediente ativo de *Bacillus alcalophilus*); ^b Produto tecnológico 2 (formulação de extratos naturais); ^c biofungicida (produto comercial a base de *B. subtilis*).

3.2. Pulverização eletrostática no manejo da MFG

3.2.1. Progresso temporal da MFG com a pulverização eletrostática

Os resultados do progresso temporal da MFG nos manejos com a pulverização eletrostática e a convencional estão exibidos na Tabela 6. Na A_{n-in}, nenhuma variável ou parâmetro estimado apresentou diferenças entre os tratamentos. Na A_{in}, em folhas inoculadas com *C. nymphaeae*, a incidência final da doença (Inc) do M_mE (20%) foi menor do que em M_mC (62,5%). Em folhas inoculadas com *C. fructicola*, o parâmetro de taxa de progresso da doença (*r*) do M_bE (1,5) e M_mE (0,5) foram menores do que em M_bC (2,8) e M_mC (2,9) respectivamente. A área abaixo da curva de progresso da doença relativa (AACPD_r) obtida por dados de severidade de folhas de amostragens destrutivas não diferiram entre os manejos com a pulverização convencional (M_bC e M_mC) e com a pulverização eletrostática (M_bE e M_mE) nas alturas avaliadas (Figura 4).

Tabela 6

Variáveis epidemiológicas e parâmetros estimados do progresso temporal da mancha foliar de *Glomerella* nos tratamentos em área não inoculada (A_{n-in}) e área inoculada (A_{in}) com as espécies *C. nymphaeae* (*Cn*) e *C. fruticola* (*Cf*).

Avaliação	Tratamento	A _{n-in}	A _{in}	
			C _n	C _f
<u>Manejos com biofungicida</u>				
Inc ^e	M _b C ^a	90,0 ns ¹	100,0 ns	82,5 ns
	M _b E ^b	100,0	80,0	72,5
t ₅₀ ^f	M _b C	113,0 ns	26,3 ns	22,0 ns
	M _b E	102,5	27,5	29,0
t ₁₀₀ ^g	M _b C	126,7 ns	45,0 ns	45,0 ns
	M _b E	122,0	42,5	46,2
R ^h	M _b C	4,9 ns	2,6 ns	2,8 a ²
	M _b E	4,6	2,4	1,5 b
y ₀ ⁱ	M _b C	0,10 ns	0,32 ns	0,19 ns
	M _b E	0,14	0,22	0,34
<u>Manejos com mancozebe</u>				
Inc	M _m E ^c	95,0 ns	62,5 b	65,0 ns
	M _m C ^d	97,5	20,0 a	30,0
t ₅₀	M _m E	117,5 ns	42,5 ns	28,7 ns
	M _m C	115,7	20,0	17,5
t ₁₀₀	M _m E	139,0 ns	50,0 ns	50,0 ns
	M _m C	136,7	28,0	29,2
r	M _m E	7,3 ns	1,9 ns	2,9 b
	M _m C	6,3	2,1	0,5 a
y ₀	M _m E	0,02 ns	0,12 ns	0,11 ns
	M _m C	0,04	0,06	0,29

^a Manejo com biofungicida eletrostático; ^b manejo com biofungicida convencional; ^c manejo com mancozebe eletrostático; ^d manejo com mancozebe convencional; ^e Incidência final; ^f tempo para atingir 50% e ^g 100% da incidência final em dias após a plena floração na A_{n-in} e em dias após a inoculação na A_{in} ; ^h taxa de progresso da doença; ⁱ inóculo inicial. ¹ ns = diferenças não significativas no teste F a 5% de probabilidade. ² Médias seguidas pela mesma letra não diferem no Tukey a 5% de probabilidade.

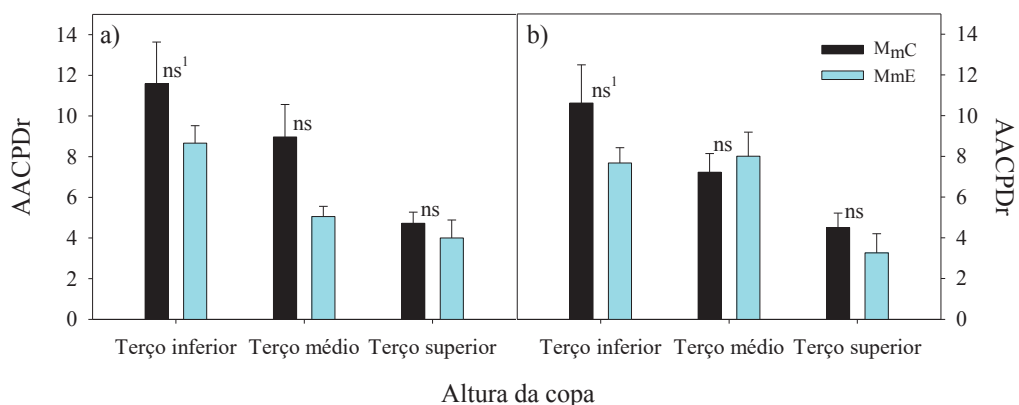


Fig. 4. Área abaixo da curva de progresso da doença relativa (AACPD_r) de mancha foliar de *Glomerella* em diferentes alturas nos tratamentos em manejos com biofungicida e mancozebe em pomar experimental com ocorrência natural da doença, Fazenda Rio Grande, Paraná, Brasil. ¹ ns = diferenças não significativas no teste F a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão.

3.2.2. Cobertura das pulverizações

A cobertura das folhas pelas pulverizações de mancozebe nos manejos M_mC e M_mE está ilustrada na Fig. 5. A cobertura da superfície abaxial no terço inferior das pulverizações com mancozebe na M_mC (2,5%) foi menor do que na M_mE (14,5%). A cobertura da superfície abaxial e adaxial do terço superior no M_mC (59,2% e 41,6%, respectivamente) foi maior do que no M_mE (1,3% e 13,4%). A porcentagem da área coberta na superfície adaxial das folhas no terço inferior não diferiu entre os tratamentos.

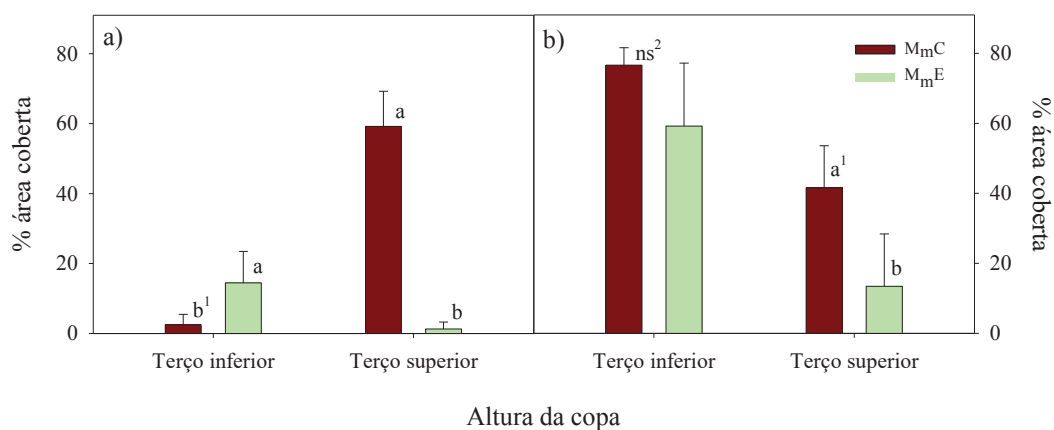


Fig. 5. Porcentagem de área coberta pela pulverização eletrostática e convencional do fungicida mancozebe durante o experimento de ‘Pulverização eletrostática no manejo da MFG’, na superfície abaxial e adaxial de folhas do terço inferior e superior da copa de macieiras em pomar experimental, Fazenda Rio Grande, Paraná, Brasil. ¹ Barras com a mesma letra não diferem no Tukey a 5% de probabilidade. ² ns = diferenças não significativas no teste F a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão.

Os resultados da cobertura das plantas por diferentes volumes de calda na pulverização eletrostática (PE) estão ilustrados na Fig. 6. A cobertura da superfície abaxial das folhas no terço inferior da copa e na superfície adaxial no terço superior pela pulverização eletrostática em volume de calda de 540 L ha⁻¹ (84,3% e 50,9%, respectivamente) e 480 L ha⁻¹ (41,0% e 65,4%, respectivamente) foram maiores a pulverização convencional (PC) (2,6% e 18,2%, respectivamente). A área foliar coberta na superfície abaxial do terço superior da copa pela PE em um volume de 360 L ha⁻¹ (22,7%) foi menor que a PC em 600 L ha⁻¹ (61,9%) e semelhante nas demais regiões avaliadas.

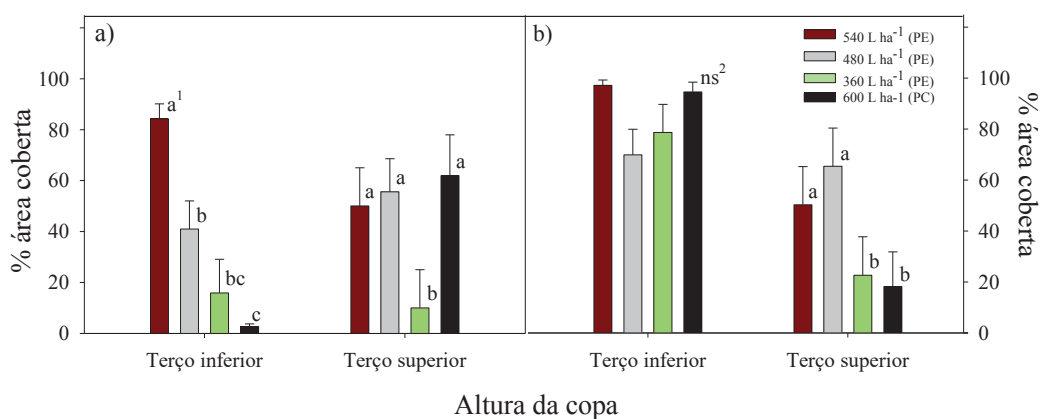


Fig. 6. Porcentagem de área coberta de folhas pela pulverização eletrostática (PE) em volume de calda de 540 L ha⁻¹, 480 L ha⁻¹, 360 L ha⁻¹ e pulverização convencional (PC) em 600 L ha⁻¹ na superfície abaxial e adaxial de folhas no terço inferior e superior da copa de macieiras em área experimental em Fazenda Rio Grande, Paraná, Brasil. ¹ Barras com a mesma letra não diferem no Tukey a 5% de probabilidade. ²ns = diferenças não significativas no teste F a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão.

4. Discussão

Os manejos com aplicações de produtos biológicos reduziram a severidade da MFG e, o manejo 1 (M₁) que recebeu aplicações do Pt₁, também atrasou a desfolha em relação a testemunha. Estes manejos tiveram 50% de redução de aplicação de químicos e foram similares os resultados do manejo 4 (M₄) que recebeu aplicações somente de produtos químicos. Com o uso de produtos biológicos no manejo da doença, o risco de resistência do patógeno aos fungicidas é reduzido, evitando a perda de eficiência de grupos químicos importantes, como já relatado para o benomyl (Hamada et al., 2009) e tiofanato metílico

(Moreira et al. 2017). Além disso, a aplicação de produtos biológicos provavelmente pode ser realizada durante a colheita, período em os pomares ficam desprotegidos, em função da carência de fungicidas. A proteção das folhas durante a colheita é crucial, pois, este período coincide com condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, resultando em incrementos de severidade (Hamada, 2013). A pulverização eletrostática mostrou resultados semelhantes a pulverização convencional e pode ser recomendada como opção para redução no volume de calda e melhoria na cobertura das plantas em regiões que são dificilmente são atingidas pela pulverização convencional.

Os manejos com produtos biológicos proporcionaram menor inóculo inicial comparados à testemunha na A_{in} . Sabe-se que a quantidade de inóculo que os tratamentos receberam foi padronizada e que o patógeno teve contato com o hospedeiro 24 horas após a aplicação dos produtos nesta área. Por isso, estes resultados sugerem que os produtos utilizados nos manejos provavelmente tiveram ação protetora no controle da doença. Esta hipótese parece válida pois, o inóculo inicial dos manejos com os produtos biológicos se assemelharam ao manejo com o mancozebe, fungicida que é tradicionalmente utilizado como produto protetor no controle de doenças de macieira (Szkolnik, 1981). A semelhança de taxa de progresso da doença nos tratamentos na A_{in} não evidenciou atividade curativa dos produtos, pois a inoculação foi realizada somente uma vez nesta área e as plantas não inoculadas não apresentaram sintomas. Assim, este parâmetro somente seria influenciado caso os produtos atuassem nos eventos após a infecção do patógeno. Reiss e Jorgensen (2017) mostraram que o biofungicida aplicado para o controle de ferrugem do trigo também teve atividade protetora e baixa ou nenhuma curativa. Nesse trabalho, os melhores resultados ocorreram quando o produto foi aplicado no mesmo dia ou um dia após a inoculação, enquanto que, o controle foi significativamente reduzido quando a aplicação foi realizada a partir de dois dias após a inoculação. Desta forma, no presente trabalho, a suposta atividade protetora dos produtos pode ter reduzido a severidade da MFG, o que refletiu na redução na área abaixo da curva de progresso da colheita dos manejos em comparação a testemunha na A_{in} .

Diferentemente da A_{in} , na A_{n-in} , os manejos com produtos biológicos e botânico proporcionaram uma área abaixo da curva de progresso da doença da doença na colheita semelhante a observada para o tratamento testemunha. Na A_{n-in} , a severidade pode não ter sido reduzida em função da insensibilidade de espécies que ocorreram naturalmente no pomar aos produtos e/ou pela falta de proteção entre intervalos de pulverização. As espécies

de *Colletotrichum* associadas a MFG podem ter diferentes sensibilidade aos produtos. Por exemplo, espécies do complexo *C. gloeosporioides* são inibidas pelo fungicida benomyl, ao contrário de espécies do complexo *C. acutatum* (Freeman et al., 1998). No entanto, as doses de campo dos produtos biológicos utilizadas nos experimentos foram maiores que a concentração mínima inibitória, ou tiveram porcentagem de inibição semelhante para as duas espécies causadoras da MFG mais frequentes nos pomares das regiões produtoras de maçã do Brasil (Moreira et al., 2019). Assim, a falta de proteção entre intervalos de pulverização parece explicar melhor a falha na redução de severidade na A_{n-in} . Durante a colheita na A_{n-in} , as plantas dos respectivos manejos receberam somente aplicações de pesticidas biológicos a cada 15 dias e, o intervalo entre pulverizações pode ter sido maior que o período de eficiência dos produtos. Wei *et al.* (2016) mostraram que 8 dias após a aplicação do biofungicida para controle de mofo cinzento em morangueiro, 50% do produto já havia sido removido da superfície da folha, provavelmente pela ação da chuva. Estas evidências sugerem que, para os produtos atuarem na redução na severidade em áreas de alta pressão de inoculo natural, como na A_{n-in} , os mesmos precisam ser pulverizados com maior frequência, assim como sugerem Wei et al. (2016) e Reiss e Jorgensen (2017) para o biofungicida. Assim, experimentos com os produtos biológicos variando intervalos de aplicação podem ser executados.

Os resultados da área abaixo da curva de redução do número de folhas da A_{n-in} mostraram que o manejo com o Pt_1 e o manejo com mancozebe foram capazes de atrasar a desfolha em comparação à testemunha. Reduzir a desfolha precoce é importante para frutíferas de clima temperado pois, quando a folha cai antecipadamente, o processo de translocação de fotoassimilados para os ramos é prejudicado, distúrbios fisiológicos ocorrem e por fim, a produção a cada ano pode reduzir (Soto-Estrada e Adaskaveg, 2004; Ojiambo et al., 2006).

No presente trabalho foi observado que a doença ocasionou lesões foliares e a desfolha antecipada. Para correlacionar os dois sintomas, a área sadia foi calculada. A área abaixo da curva de redução da área sadia teve maiores valores em todos os manejos da A_{in} e no M_1 (com aplicação de Pt_1) e no M_4 (com aplicação de mancozebe) na A_{n-in} , em comparação ao tratamento testemunha. As diferenças de resultados entre áreas podem ser explicadas pela duração dos experimentos. Na A_{in} , a queda de folhas não teve contribuição para a área sadia, pois o experimento finalizou antes da queda de todas as folhas. Assim, como a severidade foi reduzida por todos os manejos nesta área, os mesmos tiveram maior

AACRas do que a testemunha. Na A_{n-in} , as avaliações foram realizadas até a queda de todas as folhas e por isso a desfolha contribuiu para os resultados. Como o M_1 e o M_4 reduziram a queda de folhas em comparação a testemunha e tiveram severidades semelhantes entre os tratamentos, os dois manejos se destacaram nesta área. Variáveis relacionadas a área sadia podem ter correlação com a produtividade da cultura, conforme indicam estudos da quantificação de danos de doenças (Bergamin et al., 1997; Bassanezi et al., 2001; Leite et al., 2005). Seguindo esta lógica, pode-se dizer que, o M_1 em condições de pomar comercial, tem capacidade de manter a produtividade dos pomares de forma semelhante ao M_4 , com aplicação de produtos químicos. Além disso, após ajuste do intervalo de pulverizações durante a colheita o M_1 pode apresentar maior duração da quantidade de área sadia do que utilizando o manejo somente com produtos químicos.

O manejo 1 (M_1) com Pt_1 , produto formulado com o antagonista de *B. alcalophilus*, apresentou resultados com destaque aos demais manejos com produtos promissores no campo. *In vitro* também foi eficiente em menor concentração de bactérias do que o biofungicida, que já é registrado. Os resultados de campo com o Pt_1 diferem dos encontrados por Moreira e May De Mio (2015). Neste trabalho, foi adicionado adjuvantes na suspensão bacteriana e o produto propinebe foi incluído no manejo. Essas modificações podem ter proporcionado melhor eficácia desse agente no campo.

O IAF das plantas tratadas com o manejo 4 (M_4), com mancozebe, indica que os produtos aplicados tiveram capacidade de reduzir a desfolha precoce em maior grau que os demais tratamentos. Entretanto, a área abaixo da curva de progresso da doença final e a severidade média por meio de amostragens destrutivas em março do M_4 foram semelhantes a testemunha. Assim, apesar de atrasar a desfolha, o mancozebe não conseguiu segurar a severidade no final do ciclo. Uma das explicações seria a falta proteção das plantas durante a colheita. O mancozebe e propinebe tem período de carência de 7 dias, mas devido a maturação desuniforme de frutos, o período em que o pomar fica desprotegido torna-se maior. As razões para a maturação desuniforme são os reflexos da falta de adaptação climática, não atendimento as horas inverniais necessárias e a desfolha precoce, que pode ser induzida pela MFG e outras doenças foliares. Assim, considerando o ultimo motivo, acrescenta-se a necessidade de reduzir a desfolha precoce com tratamentos que evitem a doença e aumentem a duração da folha na planta. Aliado ao período de ausência de proteção no tratamento M_4 , os fungicidas podem ter tido menor eficiência em condições de alta pressão de inoculo, geradas após o período de colheita (Katsurayama e Bonetti, 2012).

Outro fator que pode ter colaborado para isso é a redução de sensibilidade de *Colletotrichum* spp. ao fungicida mancozebe como já observado por Moreira et al. (2018). Além disso, em estudo de Moreira e May De Mio (2015), o fungicida não controlou a MFG em região próxima ao presente trabalho e, os produtores tem relatado que nos últimos anos tem sido necessário o aumento da dose para controlar a doença.

Desta forma, produtos que atrasam a desfolha e, durante determinado período não possam ser aplicados, como o mancozebe, podem contribuir com maior quantidade de inoculo para a safra seguinte. Considerando que as folhas caídas no solo podem constituir fonte de inoculo para no próximo ciclo (Hamada e May De Mio, 2017), quanto maior a severidade atingida nas folhas, maior a quantidade de inóculo primário na próxima safra. No progresso temporal de murcha de *Verticillium* em oliveiras, quanto maior a quantidade de inoculo disponível antes do início do ciclo vegetativo, mais cedo são observados os sintomas (López-Escudero e Blanco-López, 2007). Além disso, Alves et al. (2008) mostra que a epidemia de ferrugem do pessegueiro foi mais severa e teve início mais cedo no segundo ano de um experimento de eficiência de fungicidas, possivelmente pelo inoculo gerado na safra anterior em plantas testemunha com alta severidade. Esta hipótese reforça a necessidade de uso de produtos durante o período de colheita para a suprimir a quantidade de doença ao longo das safras.

Com relação a pulverização eletrostática no manejo da MFG, o controle da doença foi semelhante nos tratamentos com e sem eletrização de gotas. Além disso, a pulverização eletrostática no volume de calda de 360 L ha⁻¹ utilizada nos manejos não proporcionou maior cobertura da calda na planta. Para melhorar a cobertura em regiões que podem ser importantes para o desenvolvimento da doença como o terço superior da copa (Hamada, 2013) e a superfície abaxial de folhas (Moreira e May De Mio, 2015), pode-se considerar outros volumes de calda. A melhor cobertura nestas regiões foi observada em aplicações com 540 L ha⁻¹ e 480 L ha⁻¹. Estes volumes podem ser considerados para futuros ensaios com a pulverização eletrostática no manejo da MFG. Mesmo com um volume de 540 L ha⁻¹ ocorre redução de volume de calda em comparação ao utilizado em pomares comerciais. Com redução de volume de calda, o escoamento do produto para o solo, o número de reabastecimentos da máquina e o tempo de aplicação diminuem, racionalizando melhor o uso das máquinas e equipamentos (Camilo e Palladini, 2000).

5. Conclusões

Manejos integrados de pesticidas biológicos e fungicidas reduziram a severidade da Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira em comparação a plantas sem tratamento. O manejo com um Produto tecnológico 1, formulado com o antagonista *B. alcalophilus*, também atrasou a desfolha das plantas. Estes resultados foram semelhantes ao manejo que considerou somente controle químico com fungicidas. A aplicação de mancozebe e biofungicida com a tecnologia eletrostática, considerando um volume de calda de 360 L ha⁻¹, teve controle da doença semelhante aos produtos aplicados sem eletrização de gotas em um volume de 600 L ha⁻¹. A cobertura da pulverização eletrostática nestas condições é melhor somente na superfície abaxial das folhas localizadas no terço inferior da copa. A aplicação eletrostática com 480 L ha⁻¹ e 540 L ha⁻¹ aumenta a área coberta da planta em relação a pulverização convencional com 600 L ha⁻¹ e a pulverização eletrostática com 360 L ha⁻¹.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a “Universidade Federal do Paraná (UFPR)” e a “Coordenação de Melhoria do Pessoal de Nível Superior (CAPES)”, pelo apoio e provisão de recursos necessários para a nossa pesquisa.

Referências

- Alves, G., May De Mio, L.L., Zanette, F., Oliveira, M.C., 2008. Ferrugem do pessegueiro e seu efeito na desfolha e na concentração de carboidratos em ramos e gemas. *Tropical Plant Pathology* 33(5), 370-376.
- Baiyee, B., Pornsuriy, C., Ito, S., Sunpapao, A., 2019. *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassiicola* or *Curvularia aeria*. *Biological control* 129, 195-200.
- Bassanezi, R.B., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Hau, B., Berger, R.D., 2001. Accounting for photosynthetic efficiency of bean leaves with rust, angular leaf spot and anthracnose to assess crop damage. *Plant Pathology* 50(4), 443-452.
- Bautista-Baños, B., Hernández-Lauzardo, A.N., Velázquez - Del Valle, M.G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L., 2006. Chitosan as a

potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25(2), 108-118.

Becker, W.F., Katsurayama, Y., Boneti, J.I.S., 2000. Mancha foliar da Gala: principal doença de verão da cultura da macieira. *Agropecuária Catarinense* 13, 14-20.

Bergamin Filho, A., Caneiro, S.M.T.P.G., Godoy, C.V., Amorim, L., Berger R.D., Hau, B., 1997. Angular Leaf Spot of Phaseolus Beans: Relationships Between Disease, Healthy Leaf Area, and Yield. *Phytopathology* 87(5), 506-515.

Camilo, A.P., Palladini, L.A. Efeito de diferentes volumes de calda no raleio químico de frutos da macieira ‘Gala’. *Pesquisa agropecuária brasileira* 35(11), 2191-2195.

Chaim, A., 2007. Pulverização eletrostática com bicos hidráulicos. *Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente* 17, 67-74.

Cañamás, T.P., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Solsona, C., Teixidó, N., 2011. Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. *Biological control* 56(2), 150-158.

Demerutis, C., Quiros, L., Martinuz, A., Alvarado, E., Williams, R.N., Ellis, M.A., 2008. Evaluation of an organic treatment for post-harvest control of crown rot of banana. *Ecological Engineering* 34(4), 324-327.

Elmer, P.A.G., Köhl, J., 1988. The survival and saprophytic competitive ability of the *Botrytis* spp. antagonist *Ulocladium atrum* in lily canopies. *European Journal of Plant Pathology* 104(5), 435-447.

Freeman, S., Katan, T., Shabi, E., 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82(6), 596-605.

Fu, G., Huang, S.L., Ye, Y.F., Wu, Y.G., Cen, Z.L., Lin, S.H., 2010. Characterization of a bacterial biocontrol strain B106 and its efficacy in controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose diseases. *Biological Control* 55(1), 1-10.

Gadhi, A.M., Nizamani, Z.A., Jatoti, G.H., Abro, M.A., Keerio, A.U., Poussio, G.B., Qiua, D., 2018. In-vitro efficacy of bio-control agent and essential oils against leaf blight of chickpea caused by *Alternaria alternata*. *Acta Ecologica Sinica*, <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.11.002>.

Gent, D.H., Schwartz, H.F., Nissen, S.J., 2003. Effect of Commercial Adjuvants on Vegetable Crop Fungicide Coverage, Absorption, and Efficacy. *Plant Disease* 87(5), 591-597.

González, E., Sutton, T.B., Correll, J.C., 2006. Clarification of the etiology of Glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular and pathogenicity tests. *Phytopathology* 96(9), 982-992.

Hamada, N.A., 2013. Epidemiologia da Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 117p.

Hamada, N.A., Katsurayama, Y., Dantas, A.C.M., 2009. Sensibilidade "in vitro" ao benomyl por isolados de *Colletotrichum* spp. associados à mancha da 'Gala' em macieira. *Tropical Plant Pathology* 34(5), 347-351.

Hamada, N.A., May De Mio, L.L., 2017. Survival of pathogenic *Colletotrichum* isolates on dormant buds, twigs and fallen leaves of apple trees in commercial orchards. *Fruits* 72(3), 158-165.

Higashibara, L.R., Dutra, V., Saab, O.J.G.A., Takahashi, H.W., Neves, C.S.V.J., 2013. Turboatomizador e repasse com pistola manual na cobertura de pulverização de agrotóxicos em caquizeiro (*Diospyros kaki* L.f.). *Ciência Rural* 43(5), 845-849.

Katsurayama, Y., Boneti, J.I.S., 2009. Manejo das doenças de verão da macieira no sul do Brasil. In: Stadnik, M.J. (Eds.) Manejo integrado de doenças da macieira. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, pp. 45-64.

Katsurayama, Y., Boneti, J.I.S., 2012. Manejo da mancha da Gala. *Agropecuária Catarinense* 25(2), 45-51.

Leite, R.M.V.B.C., Amorim, L., Bergamin Filho, A., 2005. Relationships of disease and leaf area variables with yield in the *Alternaria helianthi*-sunflower pathosystem. *Plant Pathology* 55(1), 73-81.

López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A., 2007. Relationship between the inoculum density of *Verticillium dahliae* and the progress of *Verticillium* wilt of olive. *Plant Disease* 91(11), 1372-1378.

Moreira R.R., Castellar, C., Hamada, N.A. May De Mio, L.L., 2017. Sensitivity of *Colletotrichum* species, associated to *Glomerella* leaf spot in apple, to mancozeb and thiophanate methyl. In: Deising, H.B., Fraaije, B., Mehl, A., Oerke, E.C., Sierotzki, H., Stammler, G. (Eds.), "Modern Fungicides and Antifungal Compounds". Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, pp.159-160.

Moreira, R.M., Duarte, H.S.S., May De Mio, L.L., 2018. Improving accuracy, precision and reliability of severity estimates of *Glomerella* leaf spot on apple leaves using a new standard area diagram set. *European Journal of Plant Pathology*, *European Journal of Plant Pathology*, <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01610-0>.

Moreira, R.M., May De Mio, L.L., 2015. Potential biological agents isolated from apple fail to control *Glomerella* leaf spot in the field. *Biological control* 87, 56-63.

Moreira, R.M., Nesi, C.N., May De Mio, L.L., 2014. *Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control *Glomerella* leaf spot. *Biological Control* 72, 30-37.

Moreira, R.M., Peres, N.A., May De Mio, L.L., 2019. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* Species Complexes Associated with Apple in Brazil, Plant Disease 103(2), 268-275.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2002. **M38-A**: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada. Wayne, U.S.A.

Ojiambo, P.S., Scherm, H., Brannen, P.M., 2006. Septoria Leaf Spot Reduces Flower Bud Set and Yield Potential of Rabbiteye and Southern Highbush Blueberries. Plant Disease 90(1), 51-57.

R Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Reiss, A., Jorgensen, L.N., 2017. Biological control of yellow rust of wheat (*Puccinia striiformis*) with Serenade® (*Bacillus subtilis* strain QST713). Crop protection 93, 1-8.

Rohini, Gowtham H.G., Hariprasad P., Singh, S.B., Niranjana, S.R., 2016. Biological control of phomopsis leaf blight of brinjal (*Solanum melongena* L.) with combining phylloplane and rhizosphere colonizing beneficial bacteria. Biological Control 101, 123-129.

Schorr, R.R., 2018. Estudos visando o desenvolvimento de novo fungicida como alternativa de controle de fitopatógenos da maçã baseada em substâncias de baixa toxicidade. Dissertação (Mestrado em Química). Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 94 p.

Shaner, G., Finney, E., 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 68, 471-475.

Soto-Estrada, A., Adaskaveg, J.E., 2004. Temporal and quantitative analyses of stem lesion development and foliar disease progression of peach rust in California. Phytopathology 94(1), 52-60.

Stockwell, V.O., Johnson, K.B., Loper, J.E., 1988. Establishment of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* on pear and apple blossoms as influenced by inoculum preparation. Phytopathology 88(6), 506-513.

Szkolnik, M., 1981. Physical Modes of Action of Sterol-Inhibiting Fungicides Against Apple Diseases. Plant Disease 65, 981-985.

Wang, C.X., Zhang, Z.F., Li, B.H., 2012. First report of Glomerella Leaf Spot of Apple Caused by *Glomerella cingulata* in China. Plant Disease 96(6), 912.

Washington, J.R., Cruz J., Lopez F., Fajardo, M., 1988. Infection Studies of *Mycosphaerella fijiensis* on Banana and the Control of Black Sigatoka with Chlorothalonil. Plant Disease 82(11), 1185-1190.

Wei, F., Xiaoping Hu, X., Xu, X., 2016. Dispersal of *Bacillus subtilis* and its effect on strawberry phyllosphere microbiota under open field and protection conditions. Sci. Rep. 6, 22611.

Zyl, S.A.V., Brink, J.C., Calitz, F.J, Coertze, S., Fourie, P.H., 2010. The use of adjuvants to improve spray deposition and *Botrytis cinerea* control on Chardonnay grapevine leaves. Crop protection 29(1), 58-67.

CAPÍTULO II: ESCALA DIAGRAMÁTICA PROPOSTA E PROGRESSO TEMPORAL DA MANCHA FOLIAR DE MARSSONINA EM MACIEIRA COMO BASE PARA ESCOLHA DE MÉTODO DE AVALIAÇÃO¹

Camilla Castellar^a; Felipe Jauch^a; Rafaela Regina Moreira^a; Henrique Da Silva Silverio Duarte^a; Louise Larissa May De Mio^a

^aDepartamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 80035-050, Brasil.

Castellar, C. (Autor correspondente). E-mail: camillacastellar12@gmail.com

Resumo

Os objetivos do trabalho foram propor uma escala diagramática para a mancha foliar de Marssonina (MFM) e fornecer bases para a escolha de método de avaliação da doença no campo a partir de experimento quantificando seu progresso temporal. A escala diagramática foi estruturada com base no padrão de folhas sintomáticas do campo. Após seu desenvolvimento, 12 avaliadores atribuíram valores de severidade de amostras com e sem o uso da escala. Parâmetros estatísticos relativos a acurácia, precisão e reprodutibilidade foram obtidos com as estimativas. O progresso temporal da MFM foi avaliado em folhas velhas e novas de ramos-do-ano selecionados e em folhas de amostragens destrutivas oriundas de diferentes porções da copa. Variáveis epidemiológicas foram calculadas e parâmetros foram estimados pelo modelo exponencial para comparar a folhas velhas e novas e alturas da copa. A escala foi estruturada com 10 diagramas com níveis de severidade que variaram de 0,2% a 96%. Os parâmetros relativos a precisão, acurácia e reprodutibilidade das estimativas foram melhorados quando a escala foi utilizada. Nas avaliações do progresso temporal em amostragens destrutivas, uma redução de 7% de severidade ocorreu entre fevereiro e março, sugerindo um erro experimental. Nestas avaliações, as severidades médias entre alturas da copa foram diferentes. Folhas novas tiveram a tendência de permanecer durante mais tempo no ramo e tiveram maior quantidade de doença final. De acordo com os resultados, formas de avaliações relacionadas a objetivos foram discutidas.

Palavras chave: *Marssonina coronaria*; *Malus domestica*; severidade; epidemiologia.

¹Capítulo normatizado segundo padrões da revista *European Journal of Plant Pathology*, exceto o idioma. Na sequência o artigo será traduzido para a língua inglesa por empresa certificada.

Introdução

A Mancha Foliar de Marssonina (MFM) é uma doença que infecta várias cultivares de macieira (Junior et al. 1986; Kretzschmar et al. 2005; Sharma et al. 2011; Kumar e Sharma 2014) e ocorre em praticamente em todas as regiões onde há produção de maçãs (CABI/EPPO 2014). A doença tem sido relatada com sintomas severos na Índia (Sharma e Gautam 1996) e tem crescido de importância na Europa (Wöhner e Emeriewen, 2018). No Brasil, a MFM também tem preocupado produtores, em especial aqueles de regiões mais quentes como São Paulo e Paraná. O agente causal é o fungo *Marssonina coronaria* (Ellis & Davis) (teleomorfo *Diplocarpon mali* Y. Harada & Sawamura) e os sintomas são lesões de coloração marrom-acinzentadas, com 5 a 10 mm de diâmetro e halo arroxeado, que ocorrem na superfície adaxial das folhas (Lee et al. 2011). Além das manchas, a doença também está relacionada com desfolha precoce (Sharma e Gautam 1997; Sharma 1999; Sharma et al. 2004).

Pesquisas têm sido realizadas visando esclarecer aspectos epidemiológicos e comparando a suscetibilidade de cultivares e de fungicidas no controle da MFM. Até o momento, nestes trabalhos, a doença foi quantificada por meio da incidência (Dang et al. 2017), severidade (Sharma et al. 2011; Kumar e Sharma 2014; Valdebenito-Sanhueza et al. 2014; Rather et al. 2017) e desfolha precoce aparente (Sharma et al. 2004). Nos estudos que utilizaram a severidade como variável, os valores atribuídos se basearam em escala de notas não padronizadas (Valdebenito-Sanhueza et al. 2014; Rather et al. 2017) ou foram subjetivas, sem nenhum auxílio (Sharma et al. 2011; Kumar e Sharma 2014). No entanto, para que os resultados garantam conclusões confiáveis e reflitam em ações corretas para manejo da doença, estas estimativas de severidade devem ser acuradas (i.e. próximas do valor real), precisas (i.e. pouca variação entre o conjunto de estimativas para uma mesma amostra) e reprodutíveis (i.e. o avaliador deve ser capaz de reproduzir as estimativas sob diferentes condições) (Nutter e Schultz 1995). Até o momento, pouco se sabe sobre estes atributos nos valores estimados de severidade de MFM pois os métodos utilizados para sua avaliação não foram validados.

Um dos modos para obter estas atribuições é estimar a severidade com auxílio de escalas diagramáticas, as quais consistem em uma sequência de imagens de parte da planta ou da planta inteira, com diferentes proporções da doença. As escalas diagramáticas já foram desenvolvidas para 107 patossistemas até 2017 (Del ponte et al. 2017), e tem melhorado a

acurácia, precisão e reprodutibilidade das estimativas de severidade de doenças em frutíferas quando comparados as avaliações sem a mesma (Michereff et al. 2009; Dolinski et al. 2017; Moreira et al. 2018).

A metodologia de avaliação para a MFM no campo ainda não foi definida. Para que as avaliações sejam adequadas e representem o que ocorre no campo, a mesma deve ter o mínimo de erros experimentais e as características da doença devem ser consideradas. Em hospedeiros arbóreos, as avaliações podem ser realizadas em unidades experimentais marcadas, como em folhas de ramos selecionados (Ojiambo e Scherm 2004; Carisse e Morissette-Thomas 2012) ou não marcadas, como em folhas de amostragens aleatórias destrutivas (Santos et al. 2007; May de mio e Ruaro 2008). Unidades experimentais marcadas podem reduzir o erro experimental (Kranz, 1988), porém a escolha do método mais adequado está atrelada as características do patossistema e ao objetivo. Por exemplo, em ferrugem do álamo, as avaliações são realizadas em folhas de amostragens destrutivas quando o objetivo é avaliar o progresso temporal da doença, pois a desfolha ocorre muito cedo e inviabiliza a coleta de dados em ramos marcados em todo o ciclo da cultura (May De Mio e Ruaro 2010). Além disso, no patossistema em questão há evidências de que folhas novas são resistentes a doença (Kumar e Sharma 2014) e que a mesma ocorre em maior intensidade na porção inferior da copa das plantas (Sharma et al. 2004). Estas características podem influenciar as avaliações no campo.

Assim, considerando que uma escala diagramática e que métodos de avaliação ajustados ao patossistema representem o que ocorre no campo os objetivos do trabalho foram I) propor uma escala diagramática para a avaliação da severidade da doença e II) fornecer bases para a escolha do método de avaliação no campo, por meio da avaliação do progresso temporal considerando duas formas de avaliação e o comportamento da doença.

Material e métodos

Desenvolvimento e validação de escala diagramática

Folhas de macieira com sintomas de Mancha Foliar de Marssonina (MFM), infectadas por inoculo natural, foram coletadas das cultivares Eva e Gala em pomar

experimental localizado em Curitiba, Paraná, Brasil, em junho de 2017. Não foram realizadas distinções entre as folhas de cada cultivar pois os sintomas foram considerados idênticos. Foram obtidas 300 amostras com grande variação na proporção da doença e distribuição das lesões no limbo foliar. Cada folha foi escaneada e salva no formato Windows bitmap com resolução de 300 dpi. Após isso, no software “Quant” (Vale et al. 2003), baseado na diferença de cor entre a área sadia e doente, foi desenvolvida uma função discriminante para o processamento das imagens e quantificação da sua severidade, designada como severidade real. Os sintomas típicos de MFM foram considerados como área doente. Regiões de coloração verde, amarelecimentos e senescências foram caracterizados como área sadia. Com base no maior e menor valor de severidade identificados e no padrão da doença demonstrado pelas folhas coletadas, diagramas com ilustrações de folhas de macieira foram estruturados no software PAINT.NET (<http://www.getpaint.net/>). Os intervalos de severidade seguiram o método de desenvolvimento da escala, onde os níveis avançam de modo linear (Nutter e Esker, 2006).

Para a validação da escala, 45 imagens de folhas escaneadas com ampla distribuição de severidade foram escolhidas. Cada imagem foi projetada no Microsoft Power Point, individualmente, para 12 avaliadores, sem experiência na quantificação de doenças de planta. Cada avaliador recebeu instruções sobre os sintomas da MFM e como realizar as avaliações, as quais foram divididas em duas etapas. Primeiramente, os avaliadores atribuíram valores de 0 a 100 por cento (%) de área sintomática para cada folha sem o auxílio da escala. Após 10 minutos de descanso, as mesmas imagens foram expostas em ordem diferente e os avaliadores estimaram a severidade da MFM comparando as folhas projetadas com a escala diagramática proposta.

Progresso temporal da MFM

Descrição do campo experimental

As avaliações da MFM no campo foram realizadas em pomar experimental que se localiza no município de Fazenda Rio Grande, Paraná, Brasil (25°39'19.5"S, 49°16'34.7"W e altitude média de 895 m). Segundo a classificação climática de Köppen, o local é caracterizado como Cfb, com clima temperado quente, precipitação em todos os meses do

ano e sem estação seca definida. Plantas nas áreas das cultivares suscetíveis Eva (241m²) e Gala (276m²), situadas lado a lado, neste pomar foram avaliadas. Cada área continha 72 plantas distribuídas em 3 linhas, onde para as avaliações foram escolhidas aleatoriamente 12 pares de plantas de cada cultivar. Assim, o arranjo experimental utilizado para as avaliações foi inteiramente casualizado com 12 unidades experimentais. Estas plantas foram conduzidas em líder central, em sistema livre, com espaçamento de 1,5 x 3,5 m e com 7 anos de idade para Eva e espaçamento de 1,5m x 4m e 5 anos de idade para Gala.

A MFM ocorreu a partir de inoculo natural presente na região, e não foram pulverizados fungicidas nas árvores avaliadas. As avaliações foram realizadas durante o ciclo vegetativo de 2017/18, tendo como base temporal dias após a plena floração (dapf), a qual ocorreu em 08/09/2017 para Eva e 19/09/2017 para Gala.

Avaliação por amostragens destrutivas e Índice de Área Foliar

A avaliação do progresso temporal da MFM por meio de amostragens destrutivas foi realizada considerando a diferença de distribuição da doença na copa das plantas identificada por Sharma *et al.* (2004). Para isso, 10 folhas foram coletadas aleatoriamente em cada repetição, em três diferentes alturas da copa: terço inferior (1 m a 1,5 m), terço médio (1,5 m a 1,9 m) e terço superior (acima de 1,9 m). A amostragem foi realizada 3 vezes durante a estação de crescimento no período onde há maior probabilidade de ocorrer incrementos de severidade devido a coincidência com as condições climáticas favoráveis descritas em Sharma *et al.* (2009). As datas das coletas foram 119 Dapf (Janeiro), 151 Dapf (Fevereiro) e 182 Dapf (Março) para Eva e 126 Dapf (Janeiro), 158 Dapf (Fevereiro) e 185 Dapf (Março). A severidade de cada folha coletada foi estimada em laboratório, com o auxílio da escala diagramática proposta. Foram obtidas médias de severidade de cada altura em cada avaliação por unidade experimental.

Para complementar os dados da amostragem destrutiva, a desfolha foi quantificada indiretamente pela redução do índice de área foliar (IAF), razão entre a área foliar do dossel e a unidade de superfície projetada no solo (m²/m²). O IAF foi obtido nas mesmas datas em que foram realizadas as amostragens destrutivas, utilizando-se o equipamento ceptômetro (OccuPAR lp-80). Nas medições, o sensor luminoso foi posicionado ao pleno sol e na sequência disposto abaixo da copa das árvores (aproximadamente 50 cm acima do solo).

Com base na diferença de radiação, o IAF foi automaticamente calculado. Foram realizadas 3 leituras para compor a média de cada unidade experimental.

Avaliação em ramos selecionados

A avaliação do progresso temporal da MFM em ramos selecionados foi realizada considerando a diferença de suscetibilidade entre folhas velhas e novas, identificada por Kumar e Sharmar (2014). Em ramos-do-ano de macieira, as folhas mais próximas ao tronco principal se desenvolvem antes do que as folhas mais próximas do ápice. Considerando isso, um ramo-do-ano por unidade experimental foi escolhido no início do ciclo vegetativo da cultura (44 dapf para ‘Eva’ e 52 dapf para ‘Gala’). Os ramos foram selecionados seguindo os critérios de altura de aproximadamente 1,5 m acima do solo (terço médio da copa), direcionado para a entrelinha e no centro do par de plantas considerado. Fitolhos foram amarrados na posição abaixo da décima folha contada a partir do ápice dos ramos selecionados. As cinco primeiras folhas a partir do fitilho foram consideradas como velhas e as cinco subsequentes como folhas novas. Cada folha foi avaliada quinzenalmente, desde o dia da marcação dos ramos, até a queda de todas as folhas avaliadas. Foram obtidos dados da incidência, da severidade, estimada com auxílio da escala diagramática proposta, e do número de folhas. Médias destas variáveis foram calculadas para cada repetição e idade da folha.

Estatística descritiva e análise de dados

Nas análises pertinentes à validação da escala diagramática foram obtidas estatísticas para as estimativas com e sem o uso da escala diagramática. Para medir a acurácia e precisão foi realizada a análise da correlação concordante de Lin (CCL) (Lin 1989) e, obtidos os parâmetros inclinação (v), deslocamento (u), fator de correção (C_b), coeficiente de correlação (r) e coeficiente de correlação concordante de Lin (CCCL) (ρ_c), descritos por Nita et al. (2003) e Bock et al. (2010). A reprodutibilidade entre avaliadores foi mensurada por meio do coeficiente de determinação (R^2) (Nutter e Schultz 1995) e também pela correlação intra-classe (ICC) (ρ) (Nita et al., 2003), onde para obter o R^2 foram realizadas regressões lineares da relação das estimativas de severidade de todos os pares de avaliadores.

Para cada estatística gerada (r , C_b , v , u , ρ_c e R^2) foi calculada a diferença entre médias (subtração entre o valor com e sem o uso da SADs) e aplicado o teste de equivalência para testar significância no parâmetro (Yi et al. 2008; Bardsley e Ngugi 2013; Yadav et al. 2013). Foram obtidos os intervalos de confiança (ICs) com 95% de probabilidade para cada estatística por meio de ‘bootstrapping’ usando o método do percentilhe (Nita et al., 2003). Somente foi considerado como resultado significativo no caso do IC não incluir zero ($\alpha = 0.05$). O erro absoluto também foi calculado para mostrar a distância dos valores estimados dos reais, sendo obtido pela subtração entre a severidade estimada e a real.

Quanto ao progresso temporal da MFM em amostragens destrutivas, as médias de severidade das alturas da copa foram comparadas. Em ramos-do-ano selecionados, variáveis epidemiológicas foram calculadas e parâmetros foram estimados e, comparados entre folhas velhas e novas. Nestas, com base na incidência da doença nas avaliações foi determinada a incidência final, tempo para atingir 50 (t_{50}) e 100% da incidência final (t_{100}). A incidência final foi calculada por meio da porcentagem do número de folhas doentes dividida pelo número total avaliado, sendo considerada doente a folha que na avaliação anterior a sua queda apresentou sintomas.

Com os dados da severidade ao longo do tempo foram obtidas áreas abaixo da CPd (AACPd) e ajustes ao modelo exponencial. A AACPd foi calculada segundo a fórmula: $AACPd = \sum_{i=1}^{n-1} [(x_i + x_{i+1})]/2 (t_{i+1} - t_i)$, sendo “n” o número de avaliações, “x” a severidade da doença e “ $(t_{i+1} - t_i)$ ” o intervalo de tempo entre duas avaliações consecutivas (Shaner e Finney, 1977). Foram obtidas duas AACPd’s considerando tempos finais diferentes para o cálculo. Para a AACPd na colheita (AACPd_c) o tempo final foi pré-estabelecido para 119 e 122 dias após a plena floração para Eva e Gala, respectivamente, onde além de ser a data da colheita nas duas cultivares, não era observado a queda de folhas. A AACPd final (AACPd_f) considerou como tempo final a data anterior a sua queda, e desta forma não foi pré-estabelecida uma data final fixa, pois o tempo para a queda da folha não foi homogênea. Os dados de severidade para folhas incidentes de cada segmento foram ajustados ao modelo exponencial, representado pela equação $Y = y_0 * \exp(-rt)$, em que Y é a severidade da doença, y_0 é o parâmetro relacionado ao inóculo inicial, r se relaciona a taxa de progresso da doença e t é o tempo em dias após a primeira avaliação.

Com base no número de folhas ao longo do tempo nos segmentos foi calculada a área abaixo da curva de redução do número de folhas (AACRnf). AACRnf foi calculada segundo

a mesma fórmula da AACPd, mas ao invés de inserir dados de “severidade” foram colocados o número de folhas e considerando como data final o último dia de avaliação.

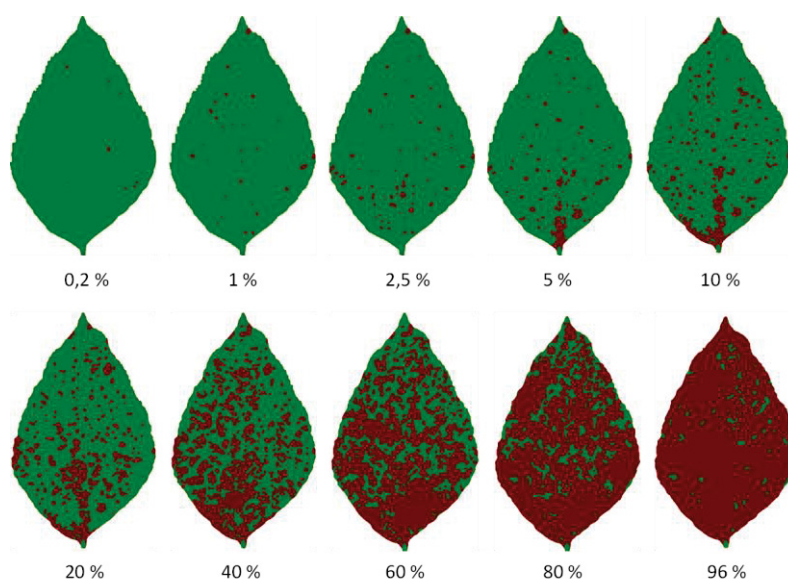
Todas as comparações foram realizadas por meio da análise de variância utilizando o teste F a 5% de probabilidade. Para atender aos pressupostos da análise de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, os dados foram submetidos, respectivamente, aos testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett. Em caso de necessidade, a transformação de Box Cox foi aplicada aos dados. Em resultados significativos da análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises deste trabalho foram realizadas no Software R (R Core Team, 2017).

Resultados

Escala diagramática para MFM

As folhas coletadas para o desenvolvimento da escala apresentaram sintomas típicos de MFM com ampla variação na área doente. Seguindo como referência o padrão de distribuição e tamanho de lesões de folhas sintomáticas do campo, a escala diagramática foi elaborada com 10 diagramas em folhas processadas e coloridas (Figura 1). A severidade dos diagramas variou de 0,2% a 96% e os intervalos tiveram avanços lineares, segundo o método moderno de desenvolvimento das escalas. Também foi verificada coalescência de lesões na porção basal do limbo a partir de 5% de severidade.

Figura 1. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha foliar de Marssonina (*Marssonina coronaria*) em folhas de macieira. Números representam a porcentagem (%) de área foliar com sintomas da doença.



Os resultados da análise da correlação concordante de Lin (CCL) estão expostos na Tabela 1. As estatísticas u , C_b , r e ρ_c que medem acurácia e precisão foram significativamente melhoradas quando a escala foi utilizada (CIs não incluíram o zero). A média do deslocamento (u) reduziu de 0,237 sem a escala para 0,015 quando a mesma foi utilizada. O fator de correção (C_b) e o coeficiente de correlação (r) tiveram média de respectivamente 0,94 e 0,95, sem o auxílio da escala, aumentaram para 0,99 e 0,98 com a escala. O CCCL (ρ_c) teve média de 0,896 sem a SADs e aumentou para 0,97 quando a mesma foi empregada. Somente a inclinação (v) não apresentou diferenças estatísticas.

Quanto a reprodutibilidade entre avaliadores, os coeficientes das duas formas de avaliação (ρ e R^2) foram significativamente diferentes, sendo melhorados com o uso da escala (Tabela 2). O coeficiente de correlação intra-classe (ρ) e o coeficiente de determinação (R^2) aumentaram de 0,860 e 0,869 sem o uso das SADs, respectivamente, para 0,952 e 0,926 com o uso da mesma (Tabela 2).

Tabela 1. Efeito do uso de escala diagramática nos parâmetros da estatística da correlação concordante de Lin (CCL) obtidos de estimativas de severidade de 45 folhas de macieira com sintomas de mancha foliar de *Marssonina* (*Marssonina coronaria*) com e sem o seu uso da escala por 12 avaliadores.

Variáveis	Médias ^a		Diferença entre médias ^b	95% ICs ^c da diferença
	Sem escala diagramática	Com escala diagramática		
Inclinação (v) ^d	1,074 (0,109)	1,016 (0,074)	-0.058 (0.036)	(-0,130, 0,011)
Deslocamento (u) ^e	0,237 (0,284)	0,015 (0,086)	-0.221 (0.082)	(-0,390, -0,067)
Fator de correção (C_b) ^f	0,939 (0,081)	0,993 (0,006)	0,054 (0,022)	(0,014, 0,101)
Coefficiente de correlação (r) ^g	0,951 (0,027)	0,978 (0,009)	0,027 (0,021)	(0,011, 0,043)
CCCL (ρ_c) ^h	0,896 (0,100)	0,972 (0,014)	0,076 (0,028)	(0,026, 0,134)

^a Os valores do desvio padrão estão entre parênteses. ^b Média da diferenças entre cada avaliação. Os valores do desvio padrão estão entre parênteses (valores calculados por bootstrap). ^c 10000 amostras de bootstrap foram usadas para obter os intervalos de confiança (ICs). Se o ICs compreende o zero, a diferença não foi significativa ($\alpha = 0.05$). Números em negrito representam diferenças significativas. ^d Viés de inclinação (v , 1= sem desvios em relação a linha de concordância). ^e Viés de deslocamento (u , 0= sem desvios em relação a linha de concordância). ^f Fator de correção (C_b) mede em que medida a linha de melhor ajuste se desvia de 45°. A precisão é medida pelo coeficiente de correlação (r). ^g A precisão é medida pelo coeficiente de correlação (r). ^h Coeficiente de correlação concordante de Lin's (CCCL) combina ambas as medidas de acurácia e precisão.

Tabela 2. Reprodutibilidade entre avaliadores, por meio do coeficiente de correlação intra-classe (ρ) e do coeficiente de determinação (R^2), das estimativas de severidade de da mancha foliar de *Marssonina*, em 45 folhas de maçã com e sem o uso da escala diagramática por 12 avaliadores.

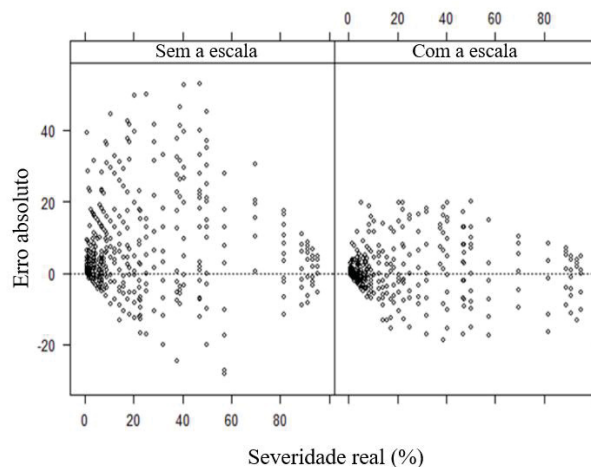
Estatísticas	Sem escala	Com escala
Coeficiente de correlação intra-classe (ρ)	0.860 (CI 0.771 - 0.918)	0.952 (CI 0.929-0.970)
Média do coeficiente de determinação (R^2) ^a	0,869 (min 0,706; max 0,953)	0,926 (min 0,822; max 0,971)
	Mean difference ^b = 0,056 (0,008), 95% (CIs 0,040, 0,073)	

^a Média do coeficiente de determinação estimados a partir de comparações par a par de avaliações por todos os avaliadores. ^b Foram utilizadas 10000 bootstraps para obter os intervalos de confiança. Se o intervalo de confiança incluir o número 0 a diferença não é significativa ($\alpha=0,05$).

O erro absoluto variou de -28,26 à 54,94 quando as avaliações foram realizadas sem a escala, sendo que somente no intervalo de 0 à 60% de severidade real foram observados erros acima de 20 (positivos e negativos). Além disso, 70,92% de erros absolutos foram positivos. Esta observação, sugere que os avaliadores tiveram tendência de superestimar a severidade quando não tiveram guia para as atribuir estimativas. Com o uso da escala não ocorreram erros absolutos acima de 20 (positivos ou negativos) e o mesmo variou num

intervalo de -18,73 à 19,96 (Figura 2). A quantidade de erros positivos reduziu para 48,71%, o que resultou em distribuição uniforme dos mesmos quando a escala foi empregada.

Figura 2. Erro absoluto (severidade estimada menos severidade real) das estimativas de severidade de folhas de macieira com sintomas de mancha foliar de Marssonina (*Marssonina coronaria*) com e sem a escala como auxílio.



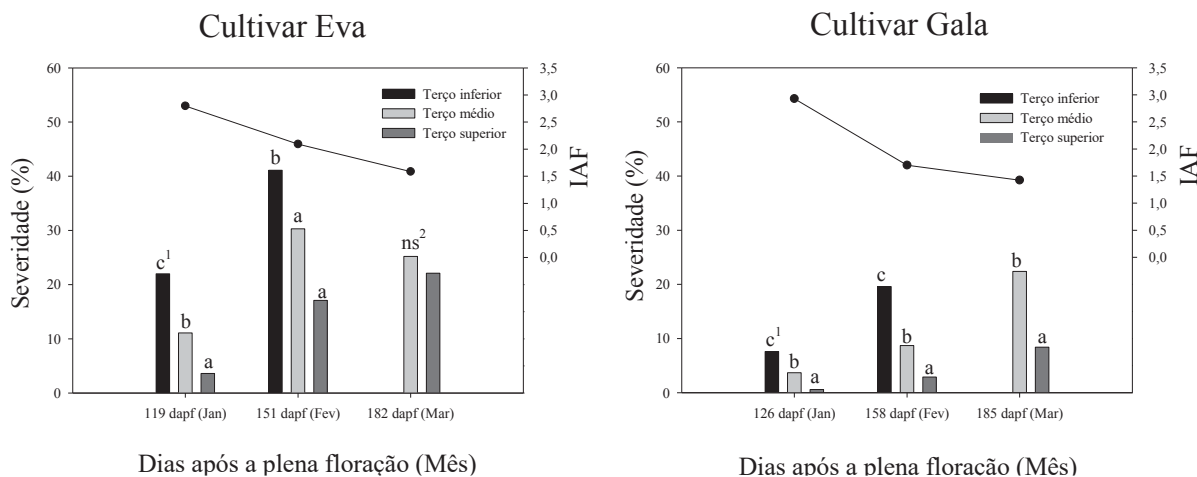
Progresso temporal da MFM

Avaliação em folhas de amostragens destrutivas e índice de área foliar

A severidade média da MFM em diferentes alturas da copa está ilustrada na Figura 4. Houveram diferenças significativas entre as alturas de todos os meses de avaliação em Gala e em janeiro em Eva. O terço inferior teve severidade média maior que as demais alturas em todas as avaliações e, as folhas desta altura só puderam ser avaliadas em janeiro e fevereiro em razão da queda foliar após esses meses. Na cultivar Eva, diferentemente dos outros meses de avaliação, a severidade entre fevereiro e março foi reduzida em 7% na porção média da copa.

Nestas avaliações, a desfolha foi quantificada considerando a redução no índice de área foliar. O IAF reduziu ao longo do tempo nas duas cultivares (Figura 4), evidenciando a desfolha na planta ao final do ciclo vegetativo. Entre janeiro e fevereiro o IAF reduziu 0,7 unidades em Eva e 1,2 unidades em Gala. Entre fevereiro e março a redução do IAF foi menor, sendo de 0,51 unidades em Eva e 0,28 em Gala.

Figura 3. Severidade média da mancha foliar de Marssonina em folhas obtidas por amostras destrutivas em três meses de avaliação no terço inferior, médio e superior da copa de macieiras cultivar Eva e Gala acompanhados do índice de área foliar (IAF) nas mesmas datas.



¹ Barras com a mesma letra não diferem no Tukey a 5% de probabilidade. ²ns = diferenças não significativas no teste F a 5% de probabilidade.

Avaliação em ramos selecionados

As variáveis e parâmetros epidemiológicos relativos a MFM em ramos selecionados da cultivar Eva e Gala estão expostos, respectivamente, na Tabela 3 e 4. As variáveis relacionadas a incidência (Incidência final - tempo para atingir 50% (t50) e 100% (t100)) e a área abaixo da curva de progresso da doença na colheita (AAPd_c), onde ainda não havia queda de folhas, e os parâmetros estimados pelo modelo (y_0 e r) não diferiram estatisticamente entre idades das folhas em ambas as cultivares. Houveram diferenças significativas somente na área abaixo da curva de progresso final (AAPd_f) e na área abaixo da curva de redução do número de folhas (AACRnf). A média da AAPd_f foi de 105,9 em folhas velhas e 213,4 em folhas novas na cultivar Eva e de 14,5 em folhas novas e 78,2 em folhas velhas na 'Gala'. A média da AACRnf foi de 523,3 e 576,3, respectivamente, em folhas velhas e novas da cultivar Eva, e de 356,7 e 416,6 nesta ordem, em folhas velhas e novas da 'Gala'. A severidade máxima observada individualmente em folhas nos ramos-do-anho marcados foi de 60% nas duas cultivares estudadas e idades das folhas.

Tabela 3. Comparação entre folhas velhas e novas por meio de variáveis e parâmetros epidemiológicos relativos a incidência, severidade da mancha foliar de Marssonina e número de folhas, em ramos selecionados na cultivar Eva.

Idade de folhas	Incidência			Severidade				Número de folhas
	Inc ^a	t50 ^b	t100 ^c	AACPdc ^d	AACPdf ^e	r ^f	y ₀ ^g	AACRnf ^h
Velhas	100,0 ns ¹	99,0 ns	111,3 ns	49,7 ns	105,9 a ²	0,086 ns	0,002 ns	523,3 b
Novas	100,0	97,9	108,0	51,9	213,4 b	0,083	0,005	576,3 a

^a Incidência final; ^b tempo para atingir 50% da incidência final em dias após a plena floração; ^c tempo para atingir 100% da incidência final em dias após a plena floração; ^d área abaixo da curva de progresso da doença na colheita; ^e área abaixo da curva de progresso da doença final; ^f taxa de progresso da doença; ^g inóculo inicial. ^h área abaixo da curva de redução do número de folhas. ¹ns = diferenças não significativas no teste F a 5% de probabilidade. ²Médias seguidas pela mesma letra não diferem no Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Comparação entre folhas velhas e novas por meio de variáveis e parâmetros epidemiológicos relativos a incidência e severidade de mancha foliar de Marssonina e número de folhas, em ramos selecionados na cultivar Gala.

Idade de folhas	Incidência			Severidade				Número de folhas
	Inc ^a	t50 ^b	t100 ^c	AACPdc ^d	AACPdf ^e	r ^f	y ₀ ^g	AACRnf ^h
Velhas	43,3 ns ¹	97,0 ns	111,8 ns	1,7 ns	14,5 a ²	0,098 ns	0,003 ns	356,7 b
Novas	63,3	112,7	122,8	2,7	78,2 b	0,080	0,008	416,6 a

^a Incidência final; ^b tempo para atingir 50% da incidência final em dias após a plena floração; ^c tempo para atingir 100% da incidência final em dias após a plena floração; ^d área abaixo da curva de progresso da doença na colheita; ^e área abaixo da curva de progresso da doença final; ^f taxa de progresso da doença; ^g inóculo inicial. ^h área abaixo da curva de redução do número de folhas. ¹ns = diferenças não significativas no teste F a 5% de probabilidade. ²Médias seguidas pela mesma letra não diferem no Tukey a 5% de probabilidade.

Discussão

A escala diagramática proposta para quantificar a severidade da Mancha Foliar de Marssonina melhorou a acurácia e a precisão das estimativas e a reprodutibilidade entre avaliadores, os quais são necessários para obtenção de resultados confiáveis e ações corretas de manejo. Os 10 diagramas desenvolvidos com incrementos lineares de severidade foram suficientes para melhorar os atributos necessários para as estimativas e também, reduzir o erro absoluto, assim como observado em escalas diagramáticas desenvolvidas para doenças com distribuição e tamanho de lesões semelhantes (Debona et al.2015; Dolinski et al. 2017) e ampla variação de severidade (Duarte et al. 2015; Moreira et al. 2018).

Quando as estimativas foram atribuídas sem o auxílio da escala, os avaliadores tiveram a tendência de superestimar a severidade, o que é comum para doenças com lesões pequenas como em ferrugem do pessegueiro (Dolinski et al. 2017) e mancha olho de rã em

soja (Debona et al. 2015). Com o uso da escala, os erros foram distribuídos e reduziram para no máximo 10% de diferença com relação a severidade real. Para reduzi-los ainda mais, os avaliadores podem ser calibrados por treinamentos computadorizados (Nutter e Schultz 1995).

Com relação a avaliação da MFM no campo, a escolha do método irá depender do objetivo do experimento. Folhas de ramos-do-ano selecionados podem ser avaliadas em trabalhos de caracterização da epidemia no tempo, ou que utilizem o progresso temporal em comparações de tratamentos, para minimizar o erro experimental das amostragens destrutivas. Este erro está relacionado ao fato de que novas brotações podem ocorrer até após a desfolha precoce em frutíferas de clima temperado (Lloyd e Couvillon 1974; Aiman 2008; Zhang et al. 2015) e amostragens destrutivas não consideram a idade das folhas. No presente trabalho, novas brotações foram observadas em fevereiro no campo (1 mês após a redução do IAF) e, possivelmente em decorrência da avaliação de folhas novas e velhas, houve redução de severidade em 7% entre fevereiro e março na porção média da cultivar Eva. Fato similar ocorreu em ferrugem do pessegueiro, patossistema cujo hospedeiro também é uma frutífera de clima temperado e a doença provoca desfolha precoce. Dolinski et al. (2017) expõe que ocorre aumento na variação de resultados de severidade ao final da epidemia em relação a seu início, em função da avaliação de novas brotações e de folhas velhas. Desta forma, após o início da queda de folhas antecipada, não há garantia do avanço da severidade nas avaliações do progresso temporal por meio de amostragens destrutivas.

Avaliações em folhas de amostragens destrutivas podem ser realizadas em estudos que exijam agilidade nas avaliações, como em comparações de vários tratamentos. Para otimizar ainda mais estas avaliações, experimentos podem ser realizados para determinar o período de avaliação que represente a epidemia para que avaliações durante todo o ciclo da cultura não sejam necessárias. Por exemplo, visando a seleção de genótipos de cana resistentes a ferrugem ‘amarela’, as avaliações podem ser realizadas em maio, pois a severidade nesta época é a que mais se relaciona com a área abaixo da curva de progresso da doença (Klosowski et al. 2015). As amostragens destrutivas também seriam indicadas para triagens visando a seleção de genótipos resistentes a MFM. Porém, Wöhner e Emeriewen (2017) discutem que a dispersão de *M. coronaria* não segue um padrão uniforme no campo e portanto, experimentos de campo podem ser arriscados para este objetivo. Considerando isso, os autores recomendam que a seleção de genótipos pode ser realizada mediante inoculação do patógeno *in vitro* ou em casa de vegetação. Após a inoculação, a severidade

das folhas inoculadas pode ser estimada com auxílio da escala proposta neste trabalho, pois há evidências que a severidade pode estar relacionada com a resistência a MFM. Durante a colonização do patógeno em folhas de macieira, ocorre expansão de hifa subcuticular, que desenvolve sintomas mesmo sem aporte de novo inoculo (Zhao et al. 2013). Wang et al. (2012) mostra que esta hifa se desenvolve mais lentamente em materiais resistentes a doença, produzindo menos sintomas que cultivares suscetíveis. Em outros patossistemas, a severidade também é utilizada como variável para classificação da suscetibilidade de genótipos (Pataky et al. 1998; Erpelding 2010; Oliveira et al. 2013; Klosowski et al. 2015).

Os resultados do presente trabalho mostraram que a distribuição da MFM não é uniforme dentro da copa, assim como anteriormente exposto por Sharma et al. (2004). Kranz (1988) comenta que avaliações aleatorizadas não são apropriadas para doenças cuja distribuição é desuniforme na planta. Assim, independentemente do método, a altura da avaliação pode ser padronizada para que não haja variação decorrente de uma sub amostra. Em doenças que também não tem distribuição uniforme, a padronização de uma altura foi considerada para estudos de comparação da eficiência de tratamentos no desenvolvimento das doenças (Assman et al. 2010; Alves et al. 2011; Moreira e May De Mio 2015). A coleta de dados nas diferentes alturas da copa pode ser realizada quando é necessário avaliar a planta inteira, pois a padronização de uma altura não irá corresponder as demais. Em outros patossistemas em que a distribuição é desuniforme na copa avaliações na planta inteira foram adequadas para estudos de caracterização da epidemia (Ojiambo e Scherm 2005; Hamada 2013; Nesi et al. 2014) ou em experimentos relacionados a eficiência da pulverização no controle da doença (Augusto et al. 2010; Bock et al. 2015).

Os resultados não significativos das variáveis epidemiológicas relativas a incidência, a área abaixo da curva de progresso da doença na colheita, anterior a queda de folhas, e no parâmetro relacionado a taxa de progresso da doença não evidenciaram a resistência de folhas novas a MFM identificada por Kumar e Sharma (2014). Durante o período de brotação, o inoculo pode não estar presente durante todo o momento e possivelmente teve contato com o hospedeiro após o período de resistência de folhas novas. A liberação de esporos para este patógeno possivelmente está relacionada com períodos chuvosos, como relatado para outras espécies do gênero *Marssonina* (Saunders 1966). A ausência de diferenças entre folhas velhas e novas também foi observada em folhas destacadas, após a expansão foliar, e inoculadas por Wohner et al. (2019). Desta forma, apesar de não

especificado por Kumar e Sharma (2014), possivelmente o período de resistência de folhas novas ocorre somente durante o período de expansão foliar.

Resultados significativamente diferentes entre folhas velhas e novas foram observados somente nas variáveis de área abaixo da curva de progresso da doença final e área abaixo da curva de redução do número de folhas, seguindo o mesmo padrão nas duas cultivares avaliadas. Relacionando as variáveis foi possível notar que folhas novas permaneceram mais tempo na planta e atingiram maior severidade, sendo que o oposto ocorreu para folhas velhas. Esta tendência poderia estar relacionada ao fato de que folhas velhas não toleram altas severidades e caem com menores proporções da doença. Isto ocorre em ferrugem do cafeeiro entre diferentes espécies do hospedeiro. Em *Coffea conilon* severidades acima de 40% causam a queda de folhas, enquanto em *C. arabica*, a severidade atinge até 80% (Capucho et al. 2011). No entanto, a severidade máxima foi a mesma para as duas idades de folhas do presente trabalho. Assim, esta diferença pode estar relacionada principalmente com características fisiológicas do próprio hospedeiro, que levam a queda de folhas velhas antes que as novas. Esta relação foi observada em desfolha induzida por *Septoria* em mirtilo. Ojiambo e Scherm (2004) modelaram o tempo para a queda de folhas com a doença e mostraram que as folhas velhas tendem a cair antes do que folhas novas independentemente da sua severidade.

Desta forma, considerando os resultados de comparação entre folhas velhas e novas do presente trabalho, foi possível recomendar a separação entre folhas velhas e novas nos ramos-do-ano somente para reduzir o número de folhas avaliadas. Avaliações exaustivas no campo podem refletir em muitos erros nas estimativas. Mas, quando o objetivo for comparar tratamentos que reduzam a queda das folhas provocada pela MFM, direcionamos a escolha para o segmento com folhas de velhas para que o contraste entre tratamentos seja evidenciado.

Em conclusão, o trabalho forneceu ferramentas validadas para as estimativas de severidade, pois a escala diagramática melhorou a precisão, acurácia e reprodutibilidade entre avaliadores, e também bases para a escolha do método de avaliação de futuros trabalhos com a MFM. Estes trabalhos são importantes devido ao crescente destaque da doença no mundo. Ainda são necessários esclarecer aspectos sobre a epidemiologia e controle da doença visando seu manejo no campo. Avaliações do progresso temporal podem ser realizadas em folhas de ramos-do-ano e amostragens destrutivas devem ser consideradas

para estudos que exijam agilidade na quantificação. A altura da copa deve ser considerada no planejamento dos experimentos.

Referências

Aiman, K. A. M. (2008). The effect of chilling, defoliation and hydrogen cyanamide on dormancy release, bud break and fruiting of Anna apple cultivar. *Scientia Horticulturae*, 118 (1), 25-32.

Alves, G., Ferreira, G. M., & May De Mio, L. L. (2011) Progresso temporal da ferrugem e fungicidas para controle das doenças foliares do pessegueiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, E, 436-440.

Assmann, A. P., Citadin, I., Santos, I., & Wagner Junior, A. (2010). Reação de genótipos de pessegueiro à ferrugem-da-folha. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 45(1), 32-40.

Augusto, J., Brenneman, T. B., Culbreath, A. K., & Sumner, P. (2010). Night spraying peanut fungicides II. Application timings and spray deposition in the lower canopy. *Plant Disease*, 94(6), 683-689.

Bardsley, S. J., & Ngugi, H. K. (2013). Reliability and accuracy of visual methods used to quantify severity of foliar bacterial spot symptoms on peach and nectarine. *Plant Pathology*, 62(2), 460-474.

Bock, C. H., Hotchkiss, M. W., Cottrell, T. E., Wood, B. W. (2015). The Effect of Sample Height on Spray Coverage in Mature Pecan Trees. *Plant Disease*, 99(7), 916-925.

Bock, C. H., Poole, G., Parker, P. E., & Gottwald, T. R. (2010). Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(2), 59-107.

CABI/EPPO (2014). *Diplocarpon mali*. [Distribution map]. Distribution Maps of Plant Diseases. Wallingford, <https://www.cabi.org/isc/datasheet/109745>. Acesso em 25 de setembro de 2018.

Capucho, A. S., Zambolim, L., Duarte, H. S. S., & Vaz, G. R. O. (2011). Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canefora*. *Plant Pathology*, 60(6), 1144-1150.

Carisse, O., & Morisette-Thomas, V. (2013). Epidemiology of Grape Anthracnose: Factors Associated with Defoliation of Grape Leaves Infected by *Elsinoë ampelina*. *Plant disease*, 97(2), 222-230.

Dang, J. L., Gleason, M. L., Liu, X., Guo, Y. Z., Zhang, R., & Sun, G. Y. (2017). Effects of Fungicides and Spray Application Interval on Controlling Marssonina Blotch of Apple in the Loess Plateau Region of China. *Plant Disease*, 101(4), 568-575.

Debona, D., Nascimento, K. J. T., Rezende, D., Rios, J. A., Bernardeli, A. M. A., Silva, L. C., & Rodrigues, F. A. (2015). A set of standard area diagrams to assess severity of frogeye leaf spot on soybean. *European Journal of Plant Pathology*, 142(3), 603-614.

Del ponte, E. M., Pethybridge, S. J., Bock, C. H., Michereff, S. J., Machado, F. J., & Spolti, P. (2017). Standard area diagrams for aiding severity estimation: Scientometrics, pathosystems and methodological trends in the last 25 years. *Phytopathology*, 107(10), 1161-1174.

Dolinski, M. A., Duarte, H. S. S., Silva, J. B., & May De Mio, L. L. (2017). Development and validation of a standard area diagram set for assessment of peach rust. *European Journal of Plant Pathology*, 148(4), 817-824.

Duarte, H. S. S., Zambolim, L., Capucho, A. S., Junior, A. F. N., Rosado, A. W. C., Cardoso, C. R., Paul, P. A., & Mizubuti, E. S. G. (2015). Development and validation of a set of standard area diagrams to estimate severity of potato early blight. *European Journal of Plant Pathology*, 137(2), 249-257.

Erpelding, J. E. (2010). Anthracnose resistance in sorghum breeding lines developed from Ethiopian germplasm. *Plant Health Progress*, <https://doi.org/10.1094/PHP-2010-1123-02-RS>.

Junior, R. P. L., Tsuneta, M., & Kishino, A. Y. (1986). Mancha Foliar de macieira causada por *Marssonina coronaria*. *Fitopatologia Brasileira*, 11(3), 725-729.

Klosowski, A. C., Bessalho Filho, J. C., Ruaro, L., Fragoso, R. B., & May De Mio, L. L. (2015). Reação De Cultivares E Época De Avaliação Da Ferrugem Alaranjada Da Cana-De-Açúcar. *Bioscience Journal*, 31(2), 489-498.

Kranz, J. (1988) Measuring plant disease. In: Kranz, J., & Rotem, J (Eds.). *Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology* (pp.35-50). Berlin: Springer.

Kretzschmar, A. A., Marodin, G. A. B., & Duarte, V. (2005). Ocorrência e intensidade de *Marssonina mali* em macieira cv. Eva nas condições da depressão central do Rio Grande do Sul. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 4(2), 145-147.

Kumar, A., & Sharma, J. N. (2014). Host plant cultivar, leaf positions and nutrition affect the expression of *Marssonina* blotch resistance in apple. *Plant Disease Research*, 29(1), 1-5.

Lee, D. H., Back, C. G., Win, N. K. K., Choi, K. H., Kim, K. M., Kang, I. K. L., Choi, C., Yoon, T. M., Uhm, J. Y., & Jun, H. Y. (2011). Biological Characterization of *Marssonina coronaria* Associated with Apple Blotch Disease. *Mycobiology*, 39(3), 200-205.

Li, Y., Hirst, P. M., Wan, Y., Liu, Y., Zhou, Q., Gao, H., Guo, Y., Zhao, Z., Wang, L., & Han, M. (2012). Resistance to *Marssonina coronaria* and *Alternaria alternata* Apple Pathotype in the Major Apple Cultivars and Rootstocks Used in China. *Hortscience*, 47(9), 1241-1244.

Lin, L. I. K. (1989). A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*, 45, 255-268.

Lloyd, D. A., & Couvillon, G. A. (1974) Effects of date of defoliation on flower and leaf bud development in the peach (*Prunus persica* (L) Batsch). *Scientia Horticulturae*, 99, 514-519.

May De Mio, L. L., & Ruaro, L. (2008). Métodos de avaliação da ferrugem do álamo e eficiência de fungicidas no seu controle. *Revista Árvore*, 32(5), 837-844.

Michereff, S. J., Noronha, M. A., Lima, G. S. A., Albert, I. C. L., Melo, E. A., & Gusmão, L. O. (2009). Diagrammatic scale to assess downy mildew severity in melon. *Horticultura Brasileira*, 27(1), 76-79.

Moreira, R. R., Duarte, H. S. S., & May De Mio, L. L. (2018). Improving accuracy, precision and reliability of severity estimates of *Glomerella* leaf spot on apple leaves using a new standard area diagram set. *European Journal of Plant Pathology*, <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01610-0>.

Moreira, R. R., & May De Mio, L. L. (2015). Potential biological agents isolated from apple fail to control *Glomerella* leaf spot in the field. *Biological control*, 87, 56-63.

Nesi, C. N., Alves, G., Junior, P. J. R., & May De Mio, L. L. (2014). Heterogeneity of peach rust disease progress within the tree canopy. *European Journal of Plant Pathology*, 139(4), 663-677.

Nita, M., Ellis, M. A., & Madden, L. V. (2003). Reliability and accuracy of visual estimation of *Phomopsis* leaf blight of strawberry. *Phytopathology*, 93(8), 995-1005.

Nutter, W., & Esker, D. (2006). The Role of Psychophysics in Phytopathology: The Weber–Fechner Law Revisited. *European Journal of Plant Pathology*, 114 (2), 199-213.

Nutter, F. W., & Schultz, P. M. (1995). Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 17(2), 174-184.

Ojiambo, P. S., & Scherm, H. (2004). Survival analyses of time to abscission of blueberry leaves affected by *Septoria* leaf spot. *Phytopathology*, 95(1), 108-113.

Ojiambo, P. S., & Scherm, H. (2005). Temporal Progress of *Septoria* Leaf Spot on Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei*). *Plant Disease*, 89(10), 1090-1096.

Oliveira, E. J., Soares, T. L., Barbosa, C. J., Santos-Filho, H. P., & Jesus, O. N. (2013). Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(2), 485-492.

Pataky, J. K., Raid, R. N., du Toit, L. J., & Schueneman, T. J. (1998). Disease severity and yield of sweet corn hybrids with resistance to northern leaf blight. *Plant Disease*, 82(1), 57-63.

R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rather, S. A., Bhat M. A., Khan, N. A., Bhat, Z. A., & Mohiddin, F. A. (2017). Influence of Weather Factors on Development of Marssonina Leaf Blotch of Apple caused by *Marssonina coronaria* [(Ell. & J. J. Davis) J. J. Davis] in Kashmir Valley, India. *Indian Journal of Ecology*, 44(4), 000-000.

Santos, F. S., Souza, P. E., Resende, M. L. V., Pozza, E. A., Miranda, J. C., Junior, P. M. R., & Manerba, F. C. (2007). Efeito de Extratos Vegetais no Progresso de Doenças Foliares do Cafeeiro Orgânico. *Fitopatologia Brasileira*, 32(1), 59-63.

Saunders, P. J. W. (1966). Epidemiological aspects of blackspot disease of roses caused by *Diplocarpon rosae* Wolf. *Annals of Applied Biology*, <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1966.tb05076.x>.

Sharma, J. N. (1999). Marssonina blotch - a new disease causing premature leaf fall in apple. *Indian Phytopathology*, 52(1), 101-102.

Sharma J. N., & Gautam D. R. (1997). Studies on Premature Leaf Fall in Apple - a New Problem. *Indian Journal of Plant Protection*, 25(1), 8-12.

Sharma, J. N., Sharma, A., & Sharma, P. (2004). Out-break of Marssonina Blotch in Warmer Climates Causing Premature Leaf Fall Problem of Apple and Its Management. *Acta Horticulturae*, 662, 405-409.

Sharma, N. V. S., Thakur, J., Mohan, S. M., Khurana, P., & Sharma, A. (2009). Epidemiology of Marssonina blotch (*Marssonina coronaria*) of apple in India. *Indian Phytopathology*, 62(3), 348-359.

Sharma, N. V. S., Thakur, J., Sharma, S., Mohan, S. M., & Khurana, P. (2011). Development of Marssonina blotch (*Marssonina coronaria*) in different genotypes of apple. *Indian Phytopathology*, 64(4), 358-362.

Valdebenito-Sanhueza, R. M., Meyer, G. A., & Bartnicki, V. A. (2014). Determinação do início da proteção das macieiras ‘Fuji’ para racionalização do controle químico de *Diplocarpon mali*. *Summa Phytopathologica*, 40(2), 182-184.

Vale, F. X. R., Fernandes Filho, E. I., & Liberato, J. R. (2003). QUANT: A software for plant disease severity assessment. In Close, R., Braithwaite M., & Havery I. (Eds.), *Proceedings of the 8th international congress of plant pathology* (pp.105). New Zealand.

Wang, J., Zhao, H., Su, S., Gao, X., & Huang, L. (2012). Effect of different *Malus* species on growth and development of *Diplocarpon mali*. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 21, 60–64. (Em chinês).

Wöhner, T., & Emeriewen, O. F. (2018). Apple blotch disease (*Marssonina coronaria* (Ellis & Davis) Davis) – review and research prospects. *European Journal of Plant Pathology*, 10.1007/s10658-018-1590-9.

Yadav, N. V. S., De Vos, S. M., Bock, C. H., & Wood, B. W. (2013). Development and validation of standard area diagrams to aid assessment of pecan scab symptoms on fruit. *Plant Pathology*, 62(2), 325-335.

Yi, Q., Wang, P. P., & He, Y. (2008). Reliability analysis for continuous measurements: equivalence test for agreement. *Statistics in Medicine*, 27(15), 2816–2825.

Zhang, Q. J., Tao, S. T., Li, M., Qi, X. X., Wu, J., Yin, H., Deng, J. L., & Zhang, S. L. (2015). Identification of differentially expressed genes using digital gene expression profiles in *Pyrus pyrifolia* Nakai cv. Hosui bud release following early defoliation. *Tree Genetics & Genomes*, 11, 1-15.

Zhao, H., Han, Q., Wang, J., Gao, X., Xiao, C. L., Liu, J., & Huang, L. (2013). Cytology of infection of apple leaves by *Diplocarpon mali*. *European Journal of Plant Pathology*, 136(1), 41-49.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O pesticida biológico composto pelo antagonista *Bacillus alcalophilus* apresentou grande potencial de uso no campo. O manejo com o produto, além de reduzir em 50% a aplicação de produtos químicos durante o ciclo, possivelmente tem menor período de carência e conseqüentemente, há chances que o mesmo seja permitido para aplicações durante a colheita. Entretanto, para o seu uso no campo, alguns ajustes ainda devem ser considerados. Pesquisas que definam o intervalo de pulverização são fundamentais para que o produto seja eficiente em condições naturais. O desenvolvimento do produto visando a comercialização também é necessária, pois não se sabe se a estocagem do produto reduz sua eficiência além de que a forma de preparo das suspensões bacterianas é inviável em larga escala.

A pulverização eletrostática também mostrou potencial uso no controle da doença e como uma opção na redução do volume de calda. Próximos estudos podem ser realizados em pomares comerciais considerando um volume de calda de 480 L ha⁻¹. No presente trabalho as aplicações foram realizadas com um pulverizador eletrostático costal, porém bicos com a tecnologia podem ser instalados em máquinas. Após a validação da aplicação eletrostática no manejo da doença, os pesticidas biológicos e botânicos também podem ser aplicados com esta tecnologia. Muitas vezes produtos com resultados promissores *in vitro* falham no campo, pois não tem a tecnologia de formulação que os fungicidas registrados possuem. Como a tecnologia eletrostática mostrou que pode aumentar a cobertura das plantas em regiões que não são atingidas pela convencional, a eficiência destes produtos também pode ser melhorada.

A escala diagramática para a avaliação da severidade de MFM foi validada e o progresso temporal da doença permitiu a identificação de métodos de avaliação adequados para cada pesquisa. A MFM tem crescido de importância no mundo e por isso, estudos epidemiológicos visando esclarecer aspectos são importantes. A epidemiologia atua no esclarecimento do comportamento da doença, para que sejam traçadas estratégias de controle com o mínimo de impacto ambiental. A disseminação do patógeno, a distribuição espacial da doença e comportamento da epidemia nas cultivares utilizadas no Brasil sob as nossas condições ambientais e a epidemiologia comparativa da doença não são esclarecidas para o patossistema e são sugestões para futuras pesquisas de campo.

REFERÊNCIAS

- AIMAN, K. A. M. The effect of chilling, defoliation and hydrogen cyanamide on dormancy release, bud break and fruiting of Anna apple cultivar. **Scientia Horticulturae**, v. 118, n. 1, p. 25-32, 2008.
- ALVES, G.; FERREIRA, G. M.; MAY DE MIO, L. L. Progresso temporal da ferrugem e fungicidas para controle das doenças foliares do pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 436-440, 2011.
- ALVES, G.; MAY DE MIO, L. L.; ZANETTE, F.; OLIVEIRA, M.C. Ferrugem do pessegueiro e seu efeito na desfolha e na concentração de carboidratos em ramos e gemas. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 5, p. 370-376, 2008.
- ASSMANN, A. P.; CITADIN, I.; SANTOS, I., WAGNER JUNIOR, A. Reação de genótipos de pessegueiro à ferrugem-da-folha. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 45, n. 1, p. 32-40, 2010.
- AUGUSTO, J.; BRENNEMAN, T. B.; CULBREATH, A. K.; SUMNER, P. Night spraying peanut fungicides II. Application timings and spray deposition in the lower canopy. **Plant Disease**, v. 94, n. 6, p. 683-689, 2010.
- BAIYEE, B.; PORNURIY, C.; ITO, S.; SUNPAPAO, A. Trichoderma spirale T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassiicola* or *Curvularia aeria*. **Biological control**, v. 129, p. 195-200, 2019.
- BARDSLEY, S. J.; NGUGI, H. K. Reliability and accuracy of visual methods used to quantify severity of foliar bacterial spot symptoms on peach and nectarine. **Plant Pathology**, v. 62, n. 2, p. 460-474, 2013.
- BASSANEZI, R. B.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B.; BERGER, R. D. Accounting for photosynthetic efficiency of bean leaves with rust, angular leaf spot and anthracnose to assess crop damage. **Plant Pathology**, v. 50, n. 4, p. 443-452, 2001.
- BAUTISTA-BAÑOS, B.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N.; VELÁZQUEZ - DEL VALLE, M. G.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; AIT BARKA, E.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C. L. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, v. 25, n. 2, p. 108-118, 2006.

BECKER, W. F.; KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Mancha foliar da Gala: principal doença de verão da cultura da macieira. **Agropecuária Catarinense**, v.13, p. 14-20, 2000.

BERGAMIN FILHO, A.; CANEIRO, S. M. T. P. G.; GODOY, C. V.; AMORIM, L.; BERGER R. D.; HAU, B. Angular Leaf Spot of Phaseolus Beans: Relationships Between Disease, Healthy Leaf Area, and Yield. **Phytopathology**, v. 87, n. 5, p. 506-515, 1997.

BOCK, C. H.; HOTCHKISS, M. W.; COTTRELL, T. E.; WOOD, B. W. The Effect of Sample Height on Spray Coverage in Mature Pecan Trees. **Plant Disease**, v. 99, n. 7, p. 916-925, 2015.

BOCK, C. H.; POOLE, G.; PARKER, P. E.; GOTTWALD, T. R. Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 2, p. 59-107, 2010.

CABI/EPPO, 2014. *Diplocarpon mali*. [Distribution map]. Distribution Maps of Plant Diseases. Wallingford, 2014.

CAMILO, A. P.; DENARDI, F. D. Cutivares: Descrição e comportamento no sul do Brasil. In: **A cultura da macieira**. Florianópolis: Epagri, 2002. p. 113-168.

CAMILO, A. P.; PALLADINI, L. A. Efeito de diferentes volumes de calda no raleio químico de frutos da macieira 'Gala'. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 35, n. 11, p. 2191-2195, 2000.

CAÑAMÁS, T. P.; VIÑAS, I.; TORRES, R.; USALL, J.; SOLSONA, C.; TEIXIDÓ, N. Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. **Biological control**, v. 56, n. 2, p. 150-158, 2011.

CAPUCHO, A. S.; ZAMBOLIM, L.; DUARTE, H. S. S.; VAZ, G. R. O. Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canefora*. **Plant Pathology**, v. 60, n. 6, p. 1144-1150, 2011.

CARISSE, O.; MORISSETE-THOMAS, V. Epidemiology of Grape Anthracnose: Factors Associated with Defoliation of Grape Leaves Infected by *Elsinoë ampelina*. **Plant disease**, v. 97, n. 2, p. 222-230, 2013.

CHAIM, A., 2007. Pulverização eletrostática com bicos hidráulicos. **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**, v. 17, p. 67-74.

CRUSIUS, L. U.; FORCELINI, C. A.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; FERNANDES, J. M. C. Epidemiology of apple leaf spot. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n. 1, p. 65-70, 2002.

DANG, J. L.; GLEASON, M. L.; LIU, X.; GUO, Y. Z.; ZHANG, R.; SUN, G. Y. Effects of Fungicides and Spray Application Interval on Controlling Marssonina Blotch of Apple in the Loess Plateau Region of China. **Plant Disease**, v. 101, n. 4, p. 568-575, 2017.

DEBONA, D.; NASCIMENTO, K. J. T.; REZENDE, D.; RIOS, J. A.; BERNARDELI, A. M. A.; SILVA, L. C.; RODRIGUES, F. A. A set of standard area diagrams to assess severity of frogeye leaf spot on soybean. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, n. 3, p. 603-614, 2015.

DEMERUTIS, C.; QUIROS, L.; MARTINUZ, A.; ALVARADO, E.; WILLIAMS, R. N.; ELLIS, M. A. Evaluation of an organic treatment for post-harvest control of crown rot of banana. **Ecological Engineering**, v. 34, n. 4, p. 324-327, 2008.

DEL PONTE, E. M.; PETHYBRIDGE, S. J.; BOCK, C. H.; MICHEREFF, S. J.; MACHADO, F. J.; SPOLTI, P. Standard area diagrams for aiding severity estimation: Scientometrics, pathosystems and methodological trends in the last 25 years. **Phytopathology**, v. 107, n. 10, p. 1161-1174, 2017.

DOLINSKI, M. A.; DUARTE, H. S. S.; SILVA, J. B.; MAY DE MIO, L. L. Development and validation of a standard area diagram set for assessment of peach rust. **European Journal of Plant Pathology**, v. 148, n. 4, p. 817-824, 2017.

DUARTE, H. S. S.; ZAMBOLIM, L.; CAPUCHO, A. S.; JUNIOR, A. F. N.; ROSADO, A. W. C.; CARDOSO, C. R.; PAUL, P. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Development and validation of a set of standard area diagrams to estimate severity of potato early blight. **European Journal of Plant Pathology**, v. 137, n. 2, p. 249-257, 2015.

ELMER, P. A. G.; KÖHL, J. The survival and saprophytic competitive ability of the *Botrytis* spp. antagonist *Ulocladium atrum* in lily canopies. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, n. 5, p. 435-447, 1988.

ERPELDING, J. E. Anthracnose resistance in sorghum breeding lines developed from Ethiopian germplasm. **Plant Health Progress**, <https://doi.org/10.1094/PHP-2010-1123-02-RS>. 2010.

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. D. S.; SCHMTIZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situation and perspectives of temperate fruit crops in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. p. 109-120, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. Crop production. < <http://www.fao.org/faostat/en/#search/apple>>. Acesso em: 02/02/2019.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

FU, G.; HUANG, S. L.; YE, Y. F.; WU, Y. G.; CEN, Z. L.; LIN, S. H. Characterization of a bacterial biocontrol strain B106 and its efficacy in controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose diseases. **Biological Control**, v. 55, n. 1, p. 1-10, 2010.

GADHI, A. M.; NIZAMANI, Z. A.; JATOI, G. H.; ABRO, M. A.; KEERIO, A. U.; POUSSIO, G. B.; QIUA, D. In-vitro efficacy of bio-control agent and essential oils against leaf blight of chickpea caused by *Alternaria alternata*. **Acta Ecologica Sinica**, <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.11.002>, 2018.

GENT, D. H.; SCHWARTZ, H. F.; NISSEN, S. J. Effect of Commercial Adjuvants on Vegetable Crop Fungicide Coverage, Absorption, and Efficacy. **Plant Disease**, v. 87, n. 5, p. 591-597, 2003.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T.B.; CORRELL, J.C. Clarification of the etiology of Glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular and pathogenicity tests. **Phytopathology**, v. 96, n. 9, p. 982-992, 2006.

HAMADA, N. A. Influência da temperatura e do período de molhamento foliar (PMF) na incidência e severidade da Mancha Foliar da Gala (*Colletotrichum* spp.). **Agropecuária Catarinense**, v. 18, n. 2, p. 73-77, 2005.

HAMADA, N.A. Epidemiologia da Mancha Foliar de Glomerella em macieira. 117 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

HAMADA, N. A.; KATSURAYAMA, Y.; DANTAS, A. C. M. Sensibilidade “in vitro” ao benomyl por isolados de *Colletotrichum* spp. associados à mancha da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 5, p. 347-351, 2009.

HAMADA, N. A.; MAY DE MIO, L. L. Survival of pathogenic *Colletotrichum* isolates on dormant buds, twigs and fallen leaves of apple trees in commercial orchards. **Fruits**, v. 72, n. 3, p. 158-165, 2017.

HARADA, Y.; SAWAMURA, K.; KONNO, K. *Diplocarpon mali*, the perfect state of apple blotch fungus *Marssonina coronaria*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 40, p. 412-418, 1974.

HAUAGGE, R.; TSUNETTA, M. 'IAPAR 75-Eva', IAPAR 76 - ANABELA' e 'IAPAR 77 – CARÍCIA' – Novas cultivares com baixa necessidade em frio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 21, n. 3, p. 239-242, 1999.

HIGASHIBARA, L. R.; DUTRA, V.; SAAB, O. J. G. A.; TAKAHASHI, H. W.; NEVES, C. S. V. J. Turboatomizador e repasse com pistola manual na cobertura de pulverização de agrotóxicos em caqui (Diospyros kaki L.f.). **Ciência Rural**, v. 43, n. 5, p. 845-849, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola. <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>>. Acesso em: 02/02/2019.

JIANG ZIDE Q. I.; PEIKUN L. I.; XIAOFAN. Effects of climate factors on the epidemic of apple Marssonina blotch in Shaanxi Province and related prediction models. **Chinese Journal of Applied Ecology**, v. 22, n. 1, p. 268-272, 2011.

JUNIOR, R. P. L.; TSUNETTA, M.; KISHINO, A. Y. Mancha Foliar de macieira causada por *Marssonina coronaria*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 725-729, 1986.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Manejo das doenças de verão da macieira no sul do Brasil. In: Stadnik, M.J. (Ed.), **Manejo integrado de doenças da macieira**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2009. p. 45-64.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Manejo da mancha da Gala. **Agropecuária Catarinense**, v. 25, n. 2, p. 45–51, 2012.

KLOSOWSKI, A. C.; BESPALHOK FILHO, J. C.; RUARO, L.; FRAGOSO, R. B.; MAY DE MIO, L. L. Reação De Cultivares E Época De Avaliação Da Ferrugem Alaranjada Da Cana-De-Açúcar. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 2, p. 489-498, 2015.

KOWATA, L. S.; STRAPASSON, M.; CHALLIOL, M. A.; MAY-DE-MIO, L. L. Glomerella leaf spot in apple: validation of proposed diagrammatic scale and efficiency of fungicides. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1502-1508, 2010.

KRANZ, J. Measuring plant disease. In: Kranz, J., & Rotem, J (Eds.). **Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology**. Berlin: Springer, 1988. p. 35-50.

KRETZSCHMAR, A. A.; MARODIN, G. A. B.; DUARTE, V. Ocorrência e intensidade de *Marssonina mali* em macieira cv. Eva nas condições da depressão central do Rio Grande do Sul. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 4, n. 2, p. 145-147, 2005.

KUMAR, A.; SHARMA, J. N. Host plant cultivar, leaf positions and nutrition affect the expression of *Marssonina* blotch resistance in apple. **Plant Disease Research**, v. 29, n. 1, p. 1-5, 2014.

LEE, D. H.; BACK, C. G.; WIN, N. K. K.; CHOI, K. H.; KIM, K. M.; KANG, I. K. L. CHOI, C.; YOON, T. M.; UHM, J. Y.; JUN, H. Y. Biological Characterization of *Marssonina coronaria* Associated with Apple Blotch Disease. **Mycobiology**, v. 39, n. 3, p. 200-205, 2011.

LEITE, R. M. V. B. C.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Relationships of disease and leaf area variables with yield in the *Alternaria helianthi*–sunflower pathosystem. **Plant Pathology**, v. 55, n. 1, p. 73-81, 2005.

LI, Y.; HIRST, P. M.; WAN, Y.; LIU, Y.; ZHOU, Q.; GAO, H.; GUO, Y.; ZHAO, Z.; WANG, L.; HAN, M. Resistance to *Marssonina coronaria* and *Alternaria alternata* Apple Pathotype in the Major Apple Cultivars and Rootstocks Used in China. **Hortscience**, v. 47, n. 9, p. 1241-1244, 2012.

LIN, L. I. K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. **Biometrics**, v. 45, p. 255-268, 1989.

LLOYD, D. A.; COUVILLON, G. A. Effects of date of defoliation on flower and leaf bud development in the peach (*Prunus persica* (L) Batsch). **Scientia Horticulturae**, v. 99, p. 514-519, 1974.

LÓPEZ-ESCUADERO, F. J.; BLANCO-LÓPEZ, M. A. Relationship between the inoculum density of *Verticillium dahliae* and the progress of *Verticillium* wilt of olive. **Plant Disease**, v. 91, n. 11, p. 1372-1378, 2007.

MICHEREFF, S. J.; NORONHA, M. A.; LIMA, G. S. A.; ALBERT, I. C. L.; MELO, E. A.; GUSMÃO, L. O. Diagrammatic scale to assess downy mildew severity in melon. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 76-79, 2009.

MAY DE MIO, L. L.; RUARO, L. Métodos de avaliação da ferrugem do álamo e eficiência de fungicidas no seu controle. **Revista Árvore**, v. 32, n. 5, p. 837-844, 2008.

MICHEREFF, S. J.; NORONHA, M. A.; LIMA, G. S. A.; ALBERT, I. C. L.; MELO, E. A.; GUSMÃO, L. O. Diagrammatic scale to assess downy mildew severity in melon. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 76-79, 2009.

MOREIRA, R.R. Etiologia da Mancha Foliar De *Glomerella* em macieira e sensibilidade do patógeno a fungicidas. 118 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

MOREIRA, R. R.; CASTELLAR, C.; HAMADA, N. A.; MAY DE MIO, L. L. Sensitivity of *Colletotrichum* species, associated to *Glomerella* leaf spot in apple, to mancozeb and thiophanate methyl. In: DEISING, H. B.; FRAAIJE, B.; MEHL, A.; OERKE, E. C.; SIEROTZKI, H.; STAMMLER, G. (Ed.), "**Modern Fungicides and Antifungal Compounds**". Braunschweig: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, 2017. pp.159-160.

MOREIRA, R. R.; DUARTE, H. S. S.; MAY DE MIO, L. L. Improving accuracy, precision and reliability of severity estimates of *Glomerella* leaf spot on apple leaves using a new standard area diagram set. **European Journal of Plant Pathology**, <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01610-0>, 2018.

MOREIRA, R. R.; MAY DE MIO, L. L. Potential biological agents isolated from apple fail to control *Glomerella* leaf spot in the field. **Biological control**, v. 87, p. 56-63, 2015.

MOREIRA, R. R.; NESI, C. N.; MAY DE MIO, L. L. *Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control *Glomerella* leaf spot. **Biological Control**, v. 72, p. 30-37, 2014.

MOREIRA, R. M.; PERES, N. A.; MAY DE MIO, L. L. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* Species Complexes Associated with Apple in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 2, p. 268-275, 2019.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **M38-A: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada**. Wayne, U.S.A, 2002.

NESI, C. N.; ALVES, G.; JUNIOR, P. J. R.; MAY DE MIO, L. L. Heterogeneity of peach rust disease progress within the tree canopy. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, n. 4, p. 663-677, 2014.

NITA, M.; ELLIS, M. A.; MADDEN, L. V. Reliability and accuracy of visual estimation of Phomopsis leaf blight of strawberry. **Phytopathology**, v. 93, n. 8, p. 995-1005, 2003.

NUTTER, W.; ESKER, D. The Role of Psychophysics in Phytopathology: The Weber–Fechner Law Revisited. **European Journal of Plant Pathology**, v. 114, n. 2, p. 199-213, 2006.

NUTTER, F. W.; SCHULTZ, P. M. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 17, n. 2, p. 174-184, 1995.

OJIAMBO, P. S.; SCHERM, H. Survival analyses of time to abscission of blueberry leaves affected by Septoria leaf spot. **Phytopathology**, v. 95, n. 1, 108-113, 2004.

OJIAMBO, P. S.; SCHERM, H. Temporal Progress of Septoria Leaf Spot on Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei*). **Plant Disease**, v. 89, n. 10, p. 1090-1096, 2005.

OJIAMBO, P. S.; SCHERM, H.; BRANNEN, P. M. Septoria Leaf Spot Reduces Flower Bud Set and Yield Potential of Rabbiteye and Southern Highbush Blueberries. **Plant Disease**, v. 90, n. 1, p. 51-57, 2006.

OLIVEIRA, E. J.; SOARES, T. L.; BARBOSA, C. J.; SANTOS-FILHO, H. P.; JESUS, O. N. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 485-492, 2013.

PATAKY, J. K.; RAID, R. N.; DU TOIT, L. J.; SCHUENEMAN, T. J. Disease severity and yield of sweet corn hybrids with resistance to northern leaf blight. **Plant Disease**, v. 82, n. 1, p. 57-63, 1998.

PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; COUTO, M.; FRANCESCATTO, E. P. Advances of the apple crop in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 48–56, 2011.

PETRI, J. L.; PALLADINI, L. A.; POLA, A.C. Dormência e indução da brotação da macieira. In: **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. p. 261-294.

PINON, P.J.; POISSONNIER, M. Etude epidemiologique du *Marssonina brunnea*. **Eur. J. For. Path.**, v. 5, p. 97-111, 1975.

R Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

RATHER, S. A.; BHAT, M. A.; KHAN, N. A.; BHAT, Z. A.; MOHIDDIN, F. A. Influence of Weather Factors on Development of Marssonina Leaf Blotch of Apple caused by *Marssonina coronaria* [(Ell. & J. J. Davis) J. J. Davis] in Kashmir Valley, India. **Indian Journal of Ecology**, v. 44, n. 4, 2017.

REISS, A.; JORGENSEN, L. N. Biological control of yellow rust of wheat (*Puccinia striiformis*) with Serenade® (*Bacillus subtilis* strain QST713). **Crop protection**, v. 93, p. 1-8, 2017.

ROHINI; GOWTHAM, H. G.; HARIPRASAD, P.; SINGH, S. B.; NIRANJANA, S. R.. Biological control of phomopsis leaf blight of brinjal (*Solanum melongena* L.) with combining phylloplane and rhizosphere colonizing beneficial bacteria. **Biological Control**, v. 101, p. 123-129, 2016.

SANTOS, F. S.; SOUZA, P. E.; RESENDE, M. L. V.; POZZA, E. A.; MIRANDA, J. C.; JUNIOR, P. M. R.; MANERBA, F. C. Efeito de Extratos Vegetais no Progresso de Doenças Foliares do Cafeeiro Orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 59-63, 2007.

SAUNDERS, P. J. W. Epidemiological aspects of blackspot disease of roses caused by *Diplocarpon rosae* Wolf. **Ann. appl. Biol.** v. 58, 1966.

SCHORR, R.R. Estudos visando o desenvolvimento de novo fungicida como alternativa de controle de fitopatógenos da maçã baseada em substâncias de baixa toxicidade. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química). Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

SHANER, G.; FINNEY, E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 68, p. 471-475, 1977.

SHARMA, J. N. Marssonina blotch - a new disease causing premature leaf fall in apple. **Indian Phytopathology**, v. 52, n. 1, p. 101-102, 1999.

SHARMA, J. N.; GAUTAM, D. R. Studies on Premature Leaf Fall in Apple - a New Problem. **Indian Journal of Plant Protection**, v. 25, n. 1, p. 8-12, 1997.

SHARMA, J. N.; SHARMA, A.; SHARMA, P. Out-break of Marssonina Blotch in Warmer Climates Causing Premature Leaf Fall Problem of Apple and Its Management. **Acta Hort**, p. 405-409, 2004.

SHARMA, N. V. S.; THAKUR, J.; MOHAN, S. M.; KHURANA, P., SHARMA, A. Epidemiology of Marssonina blotch (*Marssonina coronaria*) of apple in India. **Indian Phytopath**, v. 62, n. 3, p. 348-359, 2009.

SHARMA, N. V. S.; THAKUR, J.; SHARMA, S.; MOHAN, S. M.; KHURANA, P. Development of Marssonina blotch (*Marssonina coronaria*) in different genotypes of apple. **Indian Phytopath**, v. 64, n. 4, p. 358-362, 2011.

SOTO-ESTRADA, A.; ADASKAVEG, J. E. Temporal and quantitative analyses of stem lesion development and foliar disease progression of peach rust in California. **Phytopathology**, v. 94, n. 1, p. 52-60, 2004.

STOCKWELL, V. O.; JOHNSON, K. B.; LOPER, J. E. Establishment of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* on pear and apple blossoms as influenced by inoculum preparation. **Phytopathology**, v. 88, n. 6, p. 506-513, 1988.

SZKOLNIK, M. Physical Modes of Action of Sterol-Inhibiting Fungicides Against Apple Diseases. **Plant Disease**, v. 65, p. 981-985, 1981.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; MEYER, G. A.; BARTNICKI, V. A. Determinação do início da proteção das macieiras ‘Fuji’ para racionalização do controle químico de *Diplocarpon mali*. **Summa Phytopathol.**, v. 40, n. 2, p. 182-184, 2014.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. QUANT: A software for plant disease severity assessment. In Close, R., Braithwaite M., & Havery I. (Eds.), **Proceedings of the 8th international congress of plant pathology** (pp.105). New Zealand. 2003.

WAGGONER, P. E.; AYLOR, D. E. Epidemiology: A science of patterns. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 71-94, 2000.

WANG, C. X.; ZHANG, Z. F.; LI, B. H. First report of Glomerella Leaf Spot of Apple Caused by *Glomerella cingulata* in China. **Plant Disease**, v. 96, n. 6, p. 912, 2012.

WANG, J.; ZHAO, H.; SU, S.; GAO, X.; HUANG, L. Effect of different Malus species on growth and development of *Diplocarpon mali*. **Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica**, v. 21, p. 60-64, 2012.

WASHINGTON, J. R.; CRUZ J.; LOPEZ F.; FAJARDO, M. Infection Studies of *Mycosphaerella fijiensis* on Banana and the Control of Black Sigatoka with Chlorothalonil. **Plant Disease**, v. 82, n. 11, p. 1185-1190, 1988.

WEI, F.; XIAOPING HU, X.; XU, X. Dispersal of *Bacillus subtilis* and its effect on strawberry phyllosphere microbiota under open field and protection conditions. **Sci. Rep.** 6, 22611. 2016.

WÖHNER, T.; EMERIEWEN, O. F. Apple blotch disease (*Marssonina coronaria* (Ellis & Davis) Davis) – review and research prospects. **European Journal of Plant Pathology**, 10.1007/s10658-018-1590-9. 2018.

YADAV, N. V. S.; DE VOS, S. M.; BOCK, C. H.; WOOD, B. W. Development and validation of standard area diagrams to aid assessment of pecan scab symptoms on fruit. **Plant Pathology**, v. 62, n. 2, p. 325-335, 2013.

YI-CUN, H. Overwintering characteristics of *Marssonina coronaria* (Ell. Et da Vis). **Journal of Southwest Forestry College**, v. 1, 1986.

YI, Q.; WANG, P. P.; HE, Y. Reliability analysis for continuous measurements: equivalence test for agreement. **Statistics in Medicine**, v. 27, n. 15, p. 2816–2825, 2008.

ZHANG, Q. J.; TAO, S. T.; LI, M.; QI, X. X.; WU, J.; YIN, H.; DENG, J. L.; ZHANG, S. L. Identification of differentially expressed genes using digital gene expression profiles in *Pyrus pyrifolia* Nakai cv. Hosui bud release following early defoliation. **Tree Genetics & Genomes**, v. 11, n. 1-15, 2015.

ZHAO, H.; HAN, Q.; JIE WANG, J.; GAO, X.; XIAO, C.; LIU, J.; HUANG, L. Cytology of infection of apple leaves by *Diplocarpon mali*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 136, n. 1, p. 41-49, 2013.

ZYL, S. A. V.; BRINK, J. C.; CALITZ, F. J.; COERTZE, S.; FOURIE, P. H. The use of adjuvants to improve spray deposition and *Botrytis cinerea* control on Chardonnay grapevine leaves. **Crop protection**, v. 29, n. 1, p. 58-67, 2010.

7 ANEXOS

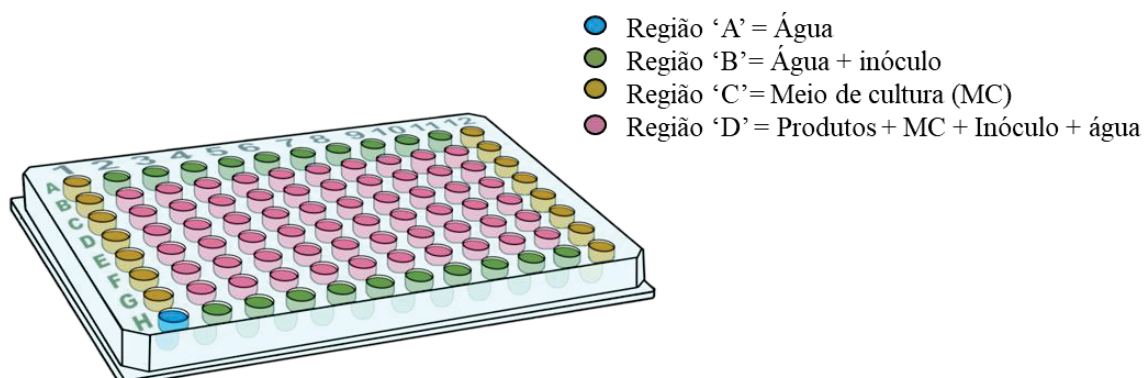
I) Resultados de experimento exploratório *ex vivo* para avaliação do produto tecnológico 2 no controle de mancha foliar de glomerella ocasionada por isolados pertencentes aos complexos *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. boninense*.

INOCULAÇÃO DE FOLHAS – FOTOS APÓS 10 DIAS



¹Concentração utilizada no experimento de campo de 'Pesticidas biológicos e botânicos no manejo da MFG'. Fonte: Moreira, R.R.

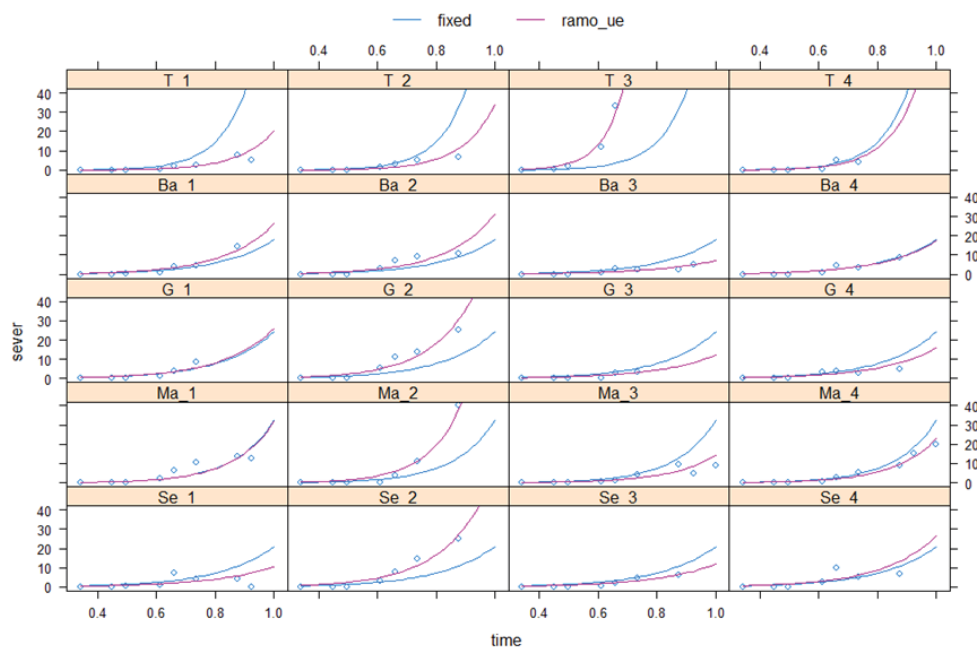
II) Esquema ilustrativo de microplacas de Elisa, seccionadas em regiões, para o teste de concentração mínima inibitória.



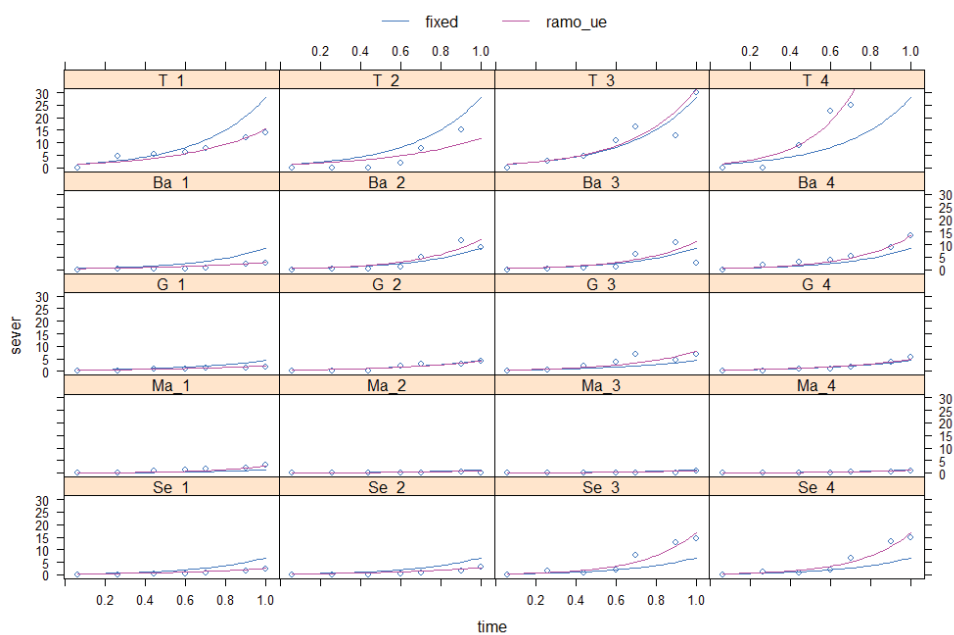
Fonte: Adaptado de Fehlbaum, et al. (1994).

8 APÊNDICES

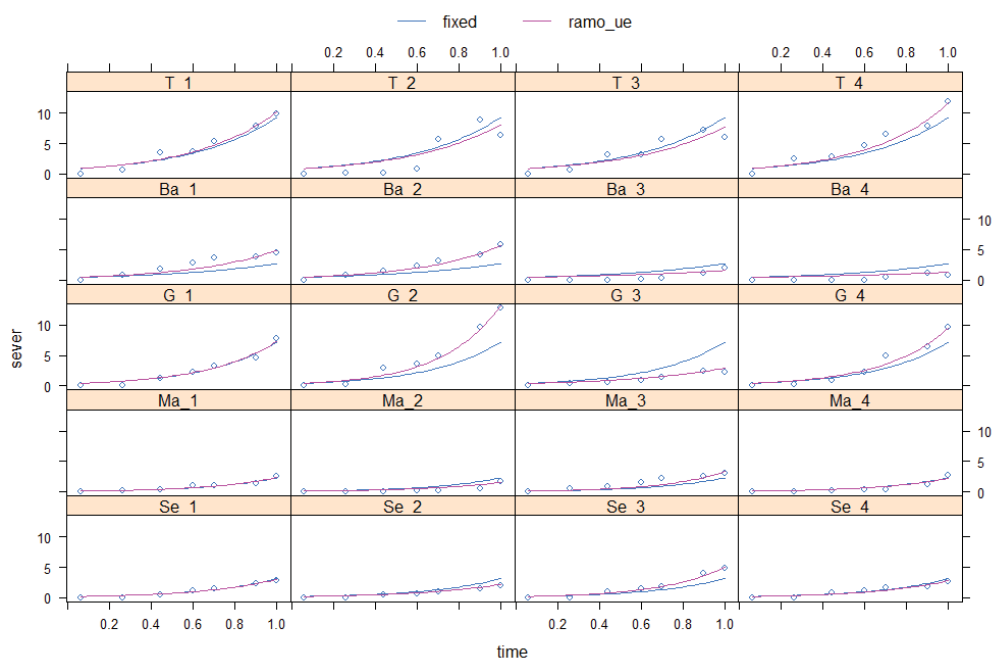
I) Ajuste dos dados de severidade de Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira cultivar Gala nos tratamentos (T=testemunha; Ba= Pt1; G= Pt2; Ma=mancozebe Se= biofungicida) na Área não Inoculada, ao modelo exponencial misto com efeitos aleatórios.



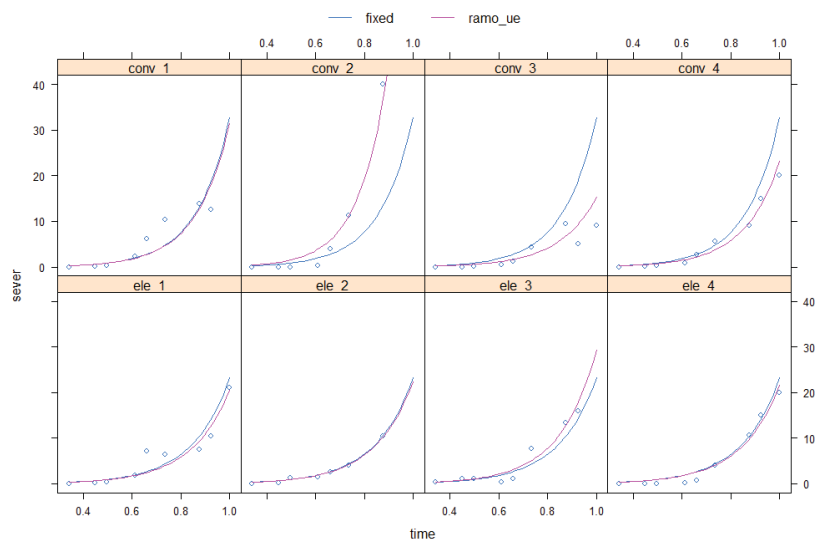
II) Ajuste dos dados de severidade de Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira, cultivar Gala, nos tratamentos (T=testemunha; Ba= Pt1; G= Pt2; Ma=mancozebe; Se= biofungicida) na Área Inoculada com *C. nymphaeae*, ao modelo exponencial misto com efeitos aleatórios.



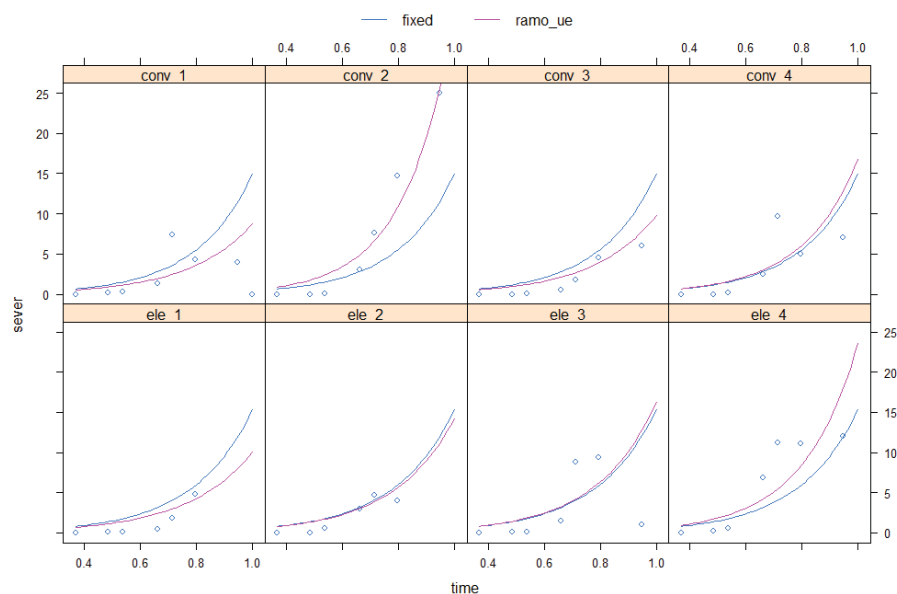
III) Ajuste dos dados de severidade de Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira, cultivar Gala, nos tratamentos (T=testemunha; Ba= Pt1; G= Pt2; Ma=mancozebe; Se= biofungicida) da Área Inoculada com *C. fructicola*, ao modelo exponencial misto com efeitos aleatórios.



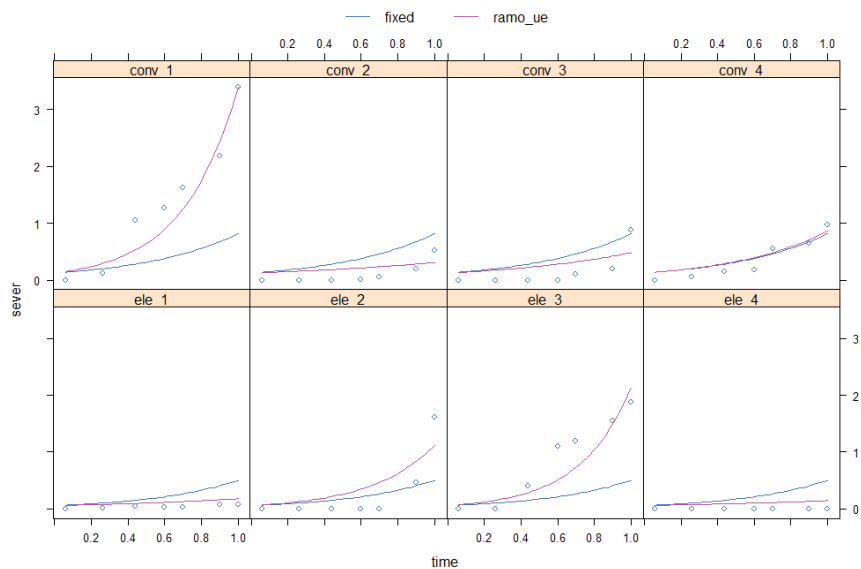
IV) Ajuste dos dados de severidade de Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira, cultivar Gala, tratadas com mancozebe por meio da pulverização eletrostática (ele) e convencional (conv) na área não inoculada, ao modelo exponencial misto com efeitos aleatórios.



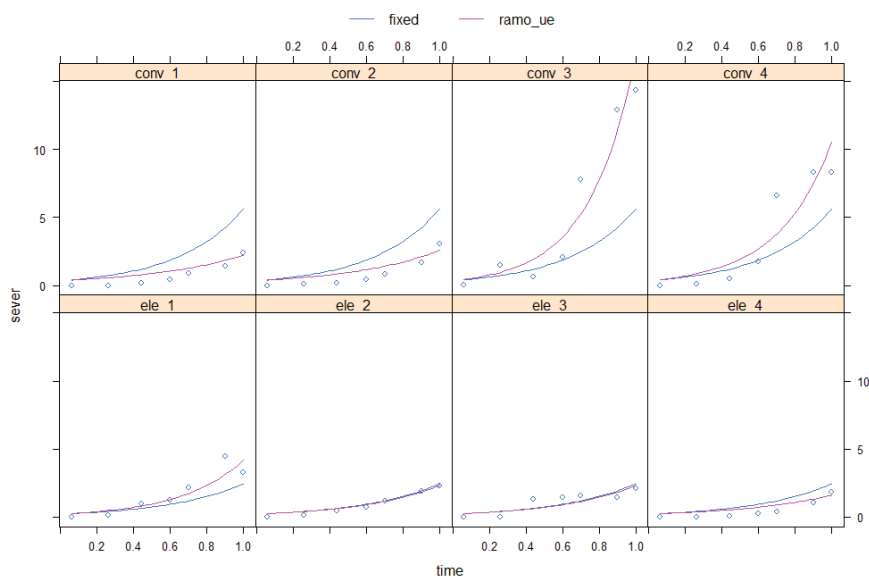
V) Ajuste dos dados de severidade de Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira cultivar Gala tratadas com biofungicida por meio da pulverização eletrostática (ele) e convencional (conv) na área não inoculada, ao modelo exponencial misto com efeitos aleatórios.



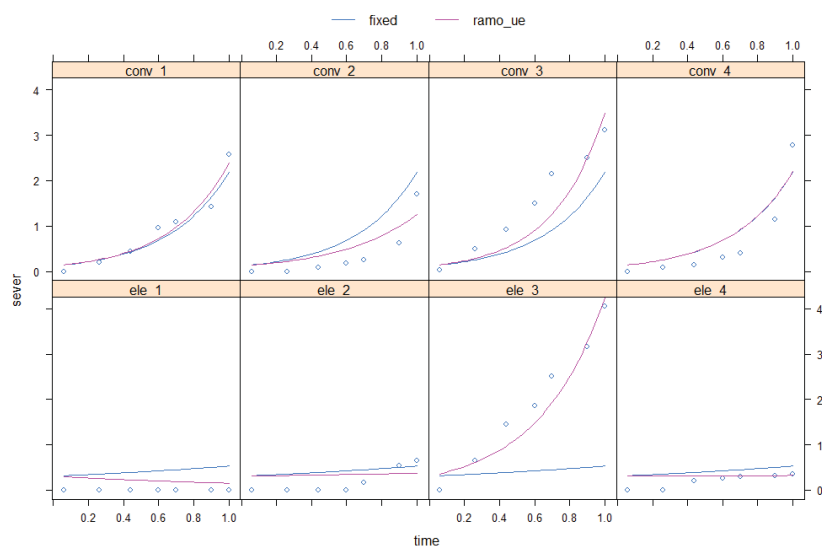
VI) Ajuste dos dados de severidade de Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira, cultivar Gala, tratadas com mancozebe por meio da pulverização eletrostática (ele) e convencional (conv) na área inoculada com *C. nymphaeae*, ao modelo exponencial misto com efeitos aleatórios.



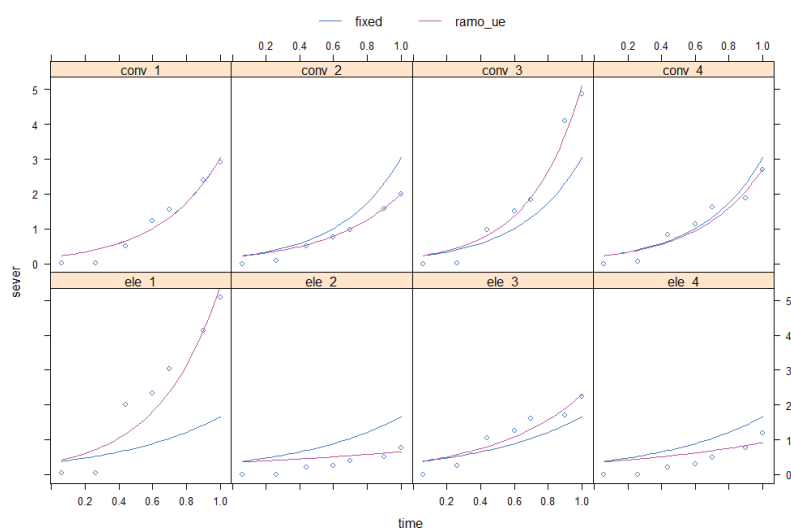
VII) Ajuste dos dados de severidade de Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira, cultivar Gala, tratadas com biofungicida por meio da pulverização eletrostática (ele) e convencional (conv) na área inoculada com *C. nymphaeae*, ao modelo exponencial misto com efeitos aleatórios.



VIII) Ajuste dos dados de severidade de Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira, cultivar Gala, tratadas com mancozebe por meio da pulverização eletrostática (ele) e convencional (conv) na área inoculada com *C. fructicola*, ao modelo exponencial misto com efeitos aleatórios.

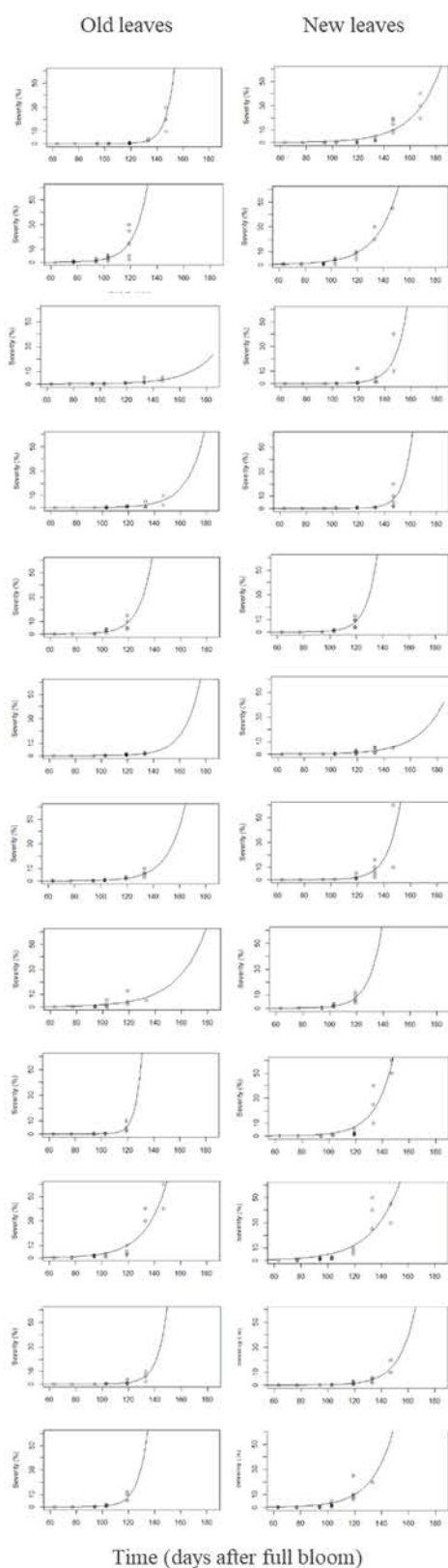


IX) Ajuste dos dados de severidade de Mancha Foliar de Glomerella em macieira, cultivar Gala, tratadas com biofungicida por meio da pulverização eletrostática (ele) e convencional (conv) na área inoculada com *C. fructicola*, ao modelo exponencial misto com efeitos aleatórios.



X) Ajuste dos dados de severidade de Mancha foliar de Marssonina em macieira obtidos de folhas velhas (old leaves) e novas (new leaves) das cultivares Eva e Gala, ao modelo exponencial.

Eva cultivar



Gala cultivar

